Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Lehrstuhl I, der Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. Siegfried Hollmann

Untersuchungen über den Carnitingehalt in menschlichen Herz- und Skelétmuskeln von verschiedenen Altersklassen und bei Erkrankungen unter Verwendung der 4,4'- Dithiodipyridin-Methode.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät in Düsseldorf vorgelegt

von

Reinhard Bunke

aus

Krefeld

1978

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Reinauer

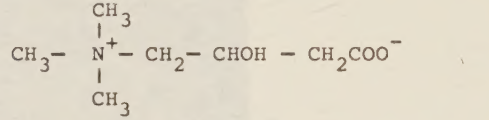
Referent
gez.: Prof. Dr. Thomitzek

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Schlipköter

A. Einleitung

1. Historische Übersicht über die Entwicklung der Carnitinforschung

Carnitin wurde 1905 in Rußland von GULEWITSCH und KRIMBERG entdeckt, im gleichen Jahr in Deutschland von KUTSCHER. Die Japaner TOMITO und SENDJU klärten rund 20 Jahre später die Struktur. Es handelt sich um das Trimethylbetain der γ-Amino-ß-hydroxybuttersäure.



CARNITIN

Heute ist nach vielen Untersuchungen sicher, daß Carnitin eine bedeutende Rolle im Fettstoffwechsel spielt. FRITZ beschrieb 1955 und 1957 eine Steigerung der Fettsäureoxidation in Leberhomogenaten durch Carnitin (18, 19) und FRIEDMAN und FRAENKEL wiesen 1955 die reversible De- und Acetylierung durc Carnitin nach (17).

FRITZ und MARQUIS erarbeiteten 1963 eine enzymatische Bestimmungsmethode für Carnitin, die seine spezifische Bestimmung in allen Geweben ermöglichte (20). So wurden in der Folgezeit von ABDEL-KADER und Wolf (1), BROEKHUYSEN und Mitarbeitern (10) und MARQUIS und FRITZ (31) umfassende Konzentrationsanalysen, u. a. auch in der Skeletmuskulatur und im Myokard von Ratten, vorgenommen.

CASILLAS und NEWBURGH prüften 1969 die Konzentration des Carnitins während der Entwicklung von Hühnerembryos (11).

Anfang der 70er Jahre wurden spezielle Effekte der diabe-

tischen Stoffwechsellage auf das Carnitin beobachtet. So berichteten MEHLMAN und Mitarbeiter über Veränderungen des Carnitin-body-pools in alloxan-diabetischen und insulinbehandelten Ratten (32) und 1971 wurde von SNOSWELL und KOUNDAKJIAN eine Relation zwischen der Konzentration an Carnitin und Coenzym-A-Estern in Geweben von normalen und alloxan-geschädigten Schafen festgestellt. Die alloxan-geschädigten Schafe wiesen erheblich höhere Konzentrationen an Carnitin auf (42).

2. Bedeutung des Carnitins im Stoffwechsel

1970 resümierte THOMITZEK (45) alle bisherigen Ergebnisse bezüglich der Funktion des Carnitins im intermediären Stoffwechsel.

Eine der wichtigsten Funktionen des Carnitins besteht darin, aktivierte Fettsäuren aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien zu transportieren. Es ist seit längerem bekannt, daß der erste Schritt der ß-Oxidation, die Bildung von Acyl-CoA ("aktivierte Fettsäure"), im Zytoplasma abläuft:

$$R\text{—}COOH + CoA + ATP \xrightarrow[\text{thetase}]{\text{Acyl-CoA-Syn-}} R\text{—}CO\text{—}CoA + AMP + PP$$

Im Gegensatz dazu laufen alle weiteren Reaktionsschritte der ß-Oxidation innerhalb der Mitochondrien ab. Hierzu müssen die aktivierten Fettsäuren in das Innere der Mitochondrien transportiert werden. Dabei spielt Carnitin eine wichtige "Vermittlerrolle". Während Acetyl-CoA und Acyl-CoA die Mitochondrienmembran nicht passieren können, passieren die entsprechenden O-Acyl-(Acetyl-)Carnitin-Ester die Mitochondrienmembran in beiden Richtungen. Auch intramitochondrial entstehendes Acetyl-CoA kann mit Hilfe von Carnitin somit ins Zytoplasma transportiert und dort von Acetyl-CoA verbrauchenden Reaktionen, wie zur Fettsäuresynthese, verwandt werden. Die Mitwirkung des Carnitins an Fettsäuretransportprozessen zwischen verschiedenen intramitochondrialen Kompartimenten ist wahrscheinlich (13).

Die reversible Acetylierung von Carnitin durch Acetyl-CoA wurde zuerst von FRIEDMAN und FRAENKEL beschrieben (17):

$$\text{Carnitin} + \text{Acetyl-CoA} \rightleftharpoons \text{O-Acetyl-Carnitin} + CoA$$

Carnitin dient hierbei als Acetylacceptor. Das Enzym, das die Reaktion katalysiert, ist die Acetyl-CoA:Carnitin-O-Acetyltransferase (Kurzbezeichnung: "Carnitin-Acetyltransferase"; E.C. 2.3.1.7); es liegt in besonders hoher Aktivität in Organen vor, die ihren energetischen Bedarf vorwiegend durch die ß-Oxidation decken. CHASE konnte zeigen, daß die enzymatische Aktivität mit Essigsäure bei optimalem pH am größten ist. Längerkettige Fettsäuren werden langsamer umgesetzt (14). Da aber auch langkettige Fettsäuren in Gegenwart von Carnitin vermehrt oxidiert werden (18, 19), war die Existenz eines weiteren Enzyms zu diskutieren. Es konnte von FRITZ und YUE (22, 23) nachgewiesen werden und wurde Acyl-CoA:Carnitin-O-Acyltransferase (Kurzbezeichnung: "Carnitin-Palmityltransferase"; E.C. 2.3.1.21) genannt. Bezüglich ihrer Aktivität gegenüber kurz- und langkettigen Fettsäuren verhalten sich beide Enzyme unterschiedlich: während die Aktivität der Carnitin-Acetyltransferase für kurzkettige Fettsäuren größer ist als für langkettige, setzt die Carnitin-Palmityltransferase besser langkettige als kurzkettige Fettsäuren um.

Im Gewebe lassen sich neben dem freien Carnitin Acetyl- und Acylcarnitine nachweisen. 85% des Carnitins verteilen sich auf das Zytoplasma, 15% auf Kern und Mitochondrien (31). Die Carnitin-Transacylasen finden sich zu einem großen Teil in der inneren Mitochondrienmembran, durch die unter Mitwirkung des Carnitins die aktivierten Fettsäuren ins Innere des Mitochondriums transportiert werden.

Carnitin stimuliert die Fettsäureoxidation und verursacht eine verstärkte Bildung von Acetyl-CoA, das mittels der

Citratcyclus-Zwischenprodukte weiter verwertet wird. Besteht ein Mißverhältnis zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, d. h. fallen vermehrt freie Fettsäuren an, oder werden sie nur unvollständig abgebaut, entstehen durch Kondensation von Acetyl-CoA-Gruppen Ketonkörper. STRACK und Mitarbeiter (44) beobachteten an normalen Tieren nach Carnitinapplikation einen Anstieg der Serumketonkörper.
BROEKHUYSEN und Mitarbeiter zeigten einen normalisierenden Effekt von Carnitingaben an ketoazidotischen Tieren (9). Ähnlich erklären sich Therapieerfolge der Anorexia nervosa unter Carnitin (3o).

Carnitin greift demnach in folgender Weise in die Stoffwechselregulation ein:

(1) Eingriff in den Fettstoffwechsel

Bei vermehrter Acetyl-CoA-Bildung (Hunger, Diabetes mellitus, orale Fettbelastung) sind die Schlüsselenzyme des Metabolismus in Richtung des Citratzyklus und der Fettsäuresynthese durch eine erhöhte Mobilisation von Acyl-CoA-Thioestern allosterisch gehemmt. Aus dem vermehrt gebildeten Acetyl-CoA entstehen Ketonkörper. Führt man Carnitin zu, so können die Acylreste der Acyl-CoA-Thioester durch Transacylierung an Carnitin gebunden werden, die Acylcarnitinkonzentration steigt an, ebenso die des freien CoA. Die Hemmung auf die Enzyme entfällt, und der physiologische Stoffwechsel des Acetyl-CoA erfolgt. So läßt sich nach BROEKHUYSEN und Mitarbeitern eine erfolgreiche Ketoazidose-Therapie durchführen. Es ist zudem eine kausale Therapie, da sie direkt

in den pathogenetischen Mechanismus eingreift. Ketonkörper werden durch CoA-Konzentrationsanstieg vermehrt oxidativ beseitigt.

(2) Eingriff in den Kohlenhydratstoffwechsel

Ist die Konzentration von Acetyl-CoA und die der Fettsäuren erhöht, setzt eine Hemmung des Enzymkomplexes ein, der die oxidative Weiterverwertung des Pyruvats zu Acetyl-CoA katalysiert, dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex. Als Ersatz läuft bevorzugt die Pyruvat-Carboxylierung zum Oxalacetat ab, und führt zu vermehrter Gluconeogenese. Verabreichungen von Carnitin sind auch hier über eine Steigerung der Konzentration des freien CoA hilfreich, das einen Effektor der Pyruvatdehydrogenase darstellt.

3. Aufgabe der vorliegenden Arbeit

Nachdem sich zahlreiche Autoren mit der Carnitinkonzentration im tierischen Muskel befaßt haben, bisher aber über den Gehalt in der menschlichen Muskulatur nur wenig bekannt ist (12), soll in dieser Arbeit der Carnitingehalt verschiedener humaner Musculi untersucht werden. Zur Analyse wurde sowohl Skeletmuskulatur verschiedener Muskelgruppen als auch Myokard herangezogen.

Folgende Fragen stellten sich und werden behandelt:

1. Gibt es post-mortale Veränderungen der Carnitinkonzentration ?
2. Haben alle Skeletmuskeln den gleichen Carnitingehalt ?
3. Stimmt die Carnitinkonzentration von Vorhof und Ventrikel des linken Herzens überein, und ist sie abhängig von pathologischen Veränderungen dieser Strukturen ?
4. Ist die Carnitinkonzentration im Muskel alters- und/oder geschlechtsabhängig, und gibt es dafür stoffwechselspezifische Gründe ?
5. Haben bestimmte Stoffwechselleiden, wie der Diabetes mellitus und Systemerkrankungen, wie Tumoren und die durch sie bedingte Kachexie, Einfluß auf die Carnitinkonzentration in der Muskulatur ?
6. Lassen sich die Herz- und Skeletmuskelbefunde beim Menschen in Einklang bringen mit Ergebnissen von Untersuchungen an verschiedenen Tierspezies ?

Bei der Lösung dieser Aufgaben ergaben sich unerwartete Schwierigkeiten bei der Anwendung der bisher beschriebenen

Methode der enzymatischen Carnitinbestimmung. Es ergab sich daher die Notwendigkeit, eine zuverlässige Methode zur Carnitinbestimmung in Muskelproben zu erarbeiten.

B. Methodischer Teil

Die enzymatische Carnitinbestimmung beruht auf der Transacetylierungsreaktion mit Acetyl-CoA. Nach PEARSON und Mitarbeitern (35) reagiert das freiwerdende CoA-SH in einer Indikatorreaktion nichtenzymatisch mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat (DTNB) unter Bildung eines farbigen Benzoat-Anions, dem Meta-Thio-2-nitrobenzoat, dessen Absorption bei 412 nm bestimmt wird.

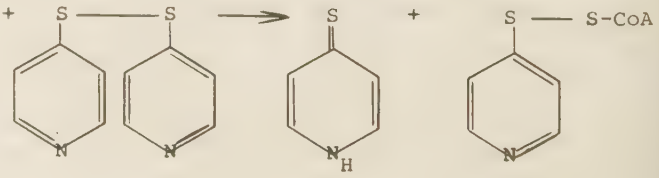
Bereits FRITZ und SCHULTZ (21) erkannten, daß die Hemmung des Enzyms durch das DTNB eine genaue Bestimmung des Carnitins mit diesem Indikator erschwert.

Deshalb benutzten wir einen anderen Indikator zum Nachweis der entstehenden SH-Gruppen.

1. Prinzip der enzymatischen (-)-Carnitinbestimmung nach der 4,4'-Dithiodipyridin-Methode

Die Methode des Nachweises freier SH-Gruppen, die von GRASSETTI und MURRAY (24) beschrieben wurde, basiert auf der Reaktion eines heteroaromatischen Disulfids mit SH-Gruppen. Es handelt sich um das 4,4'-Dithiodipyridin, welches sich mit CoA-SH zu einem gemischten Disulfid und einem Molekül 4-Mercaptopyridin umsetzt:

(1) Carnitin + Acetyl-CoA $\overset{\text{CAT}}{\rightleftharpoons}$ Acetylcarnitin + CoA-SH

(2) CoA-SH +  S-CoA

4-Mercaptopyridin liegt überwiegend in der tautomeren Thionform mit dem Proton am Stickstoff vor (2); das 4,4'-Dithiodipyridin liegt dagegen in der tautomeren Thiolform vor.

Beide tautomeren Formen weisen unterschiedliche UV-Absorptionsspektren auf. So ist es möglich, mit Hilfe eines Spektralphotometers den Verlauf der Reaktion des 4,4'-Dithiodipyridins mit den SH-Gruppen zu verfolgen. Als Wellenlänge bietet sich 334 nm an, da sie nahe dem Absorptionsmaximum des 4-Mercaptopyridins von 324 nm liegt. Die Bildung einer äquivalenten Menge an freiem 4-Mercaptopyridin führt zu einem Extinktionsanstieg und erlaubt mithin eine quantitative SH-Gruppenbestimmung. Theoretisch soll ein Molekül 4-Mercaptopyridin pro SH-Gruppe freigesetzt werden. Den experimentellen Beweis dafür erbringt folgender Versuch:

Verschiedene Mengen des 4-Mercaptopyridins wurden in Kaliumphosphatpuffer (o,1 Mol/l, pH 7,2) gelöst und die Extinktion bei 334 nm bestimmt. Desgleichen wurden unterschiedliche Carnitinkonzentrationen in der oben beschriebenen Weise umgesetzt und die Extinktion bei 334 nm registriert.
Tabelle 1 zeigt die dabei gemessenen Extinktionen und die daraus errechneten Extinktionskoeffizienten.
Die Differenz der Mittelwerte der Extinktionskoeffizienten beträgt 2,1%.

Da sich bei beiden Versuchsreihen die Extinktionskoeffizienten nicht signifikant unterscheiden, kann als bestätigt gelten, daß pro Molekül Carnitin ein Molekül 4-Mercaptopyridin gebildet wird.

Aus der Abbildung 1 geht hervor, daß der Umsatz stöchiometrisch erfolgt.

2. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten der Mercaptopyridine

Zur Ermittlung der molaren Extinktionskoeffizienten des 4,4'-Dithiodipyridins (DTP) und des 4-Mercaptopyridins wurden ihre Absorptionsspektren aufgenommen und die Absorptionsmaxima bestimmt. Dabei interessierten vor allem die Extinktionskoeffizienten bei der zur Messung benutzten Wellenlänge von 334 nm. [1)]

Der Nachweis der Reinheit des Dithiodipyridins wurde mittels Dünnschichtchromatographie erbracht. Als Laufmittel wurde Chloroform/Methanol/Benzol im Verhältnis 4 : 1 : 1 benutzt. Unter der UV-Lampe konnte immer nur ein Fleck nachgewiesen werden. 4-Mercaptopyridin wurde nach KOENIG und KINNE (29) aus Benzol umkristallisiert. Die Reinheitsprüfung des 4-Mercaptopyridins mittels Dünnschichtchromatographie stieß auf Schwierigkeiten, da die Substanz schnell oxidiert wird. Massenspektrometrisch ergab sich, daß die Verunreinigung mit DTP unter o,1% lag (Für die Durchführung der Messung sind wir Herrn Dr. Uwe Matthiesen zu großem Dank verpflichtet.).

Die Absorptionsspektren wurden automatisch mit einem BECKMAN-Spektralphotometer Acta III aufgenommen. Sie sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt. In der Tabelle 2 sind die Extinktionskoeffizienten für die Maxima und für die von uns benutzte Meßwellenlänge von 334 nm zusammengestellt.

1) Ausgangsmaterialien: 4,4'-DTP ("reinst", Firma FLUKA, Schweiz)
4-Mercaptopyridin ("techn.", EGA-Chemie, Steinheim/Albuch)

Der von uns ermittelte Wert beim Maximum von 324 nm liegt um 8,4% höher als der Wert von GRASSETTI und MURRAY (25). Zu beachten ist, daß das DTP einen nicht zu vernachlässigenden Extinktionskoeffizienten bei der Meßwellenlänge von 334 nm hat (s. u.).

3. Beschreibung der Carnitinbestimmung nach der 4,4'- Dithiodipyridinmethode in Muskelproben

3.1 Extraktion von Carnitin aus menschlicher Muskulatur

Die Extraktion erfolgt in Anlehnung an BØHMER und Mitarbeiter (8). Dabei werden freies Carnitin und Acylcarnitine erfaßt.

Die aus Leichen gewonnenen Muskelproben werden bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet.
In einem Zentrifugenglas, das mit 1o ml Chloroform/Methanol 3 : 2 gefüllt ist, werden die Proben mit einer Schere, dann eine Minute mit dem Ultraturrax zerkleinert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 3ooo U/min wird der Überstand in einen 1oo ml Kolben dekantiert und das Sediment erneut in 1o ml Chloroform/Methanol aufgenommen, homogenisiert und abzentrifugiert. Insgesamt wird der Vorgang dreimal wiederholt.
Der Gesamtüberstand wird zur Hydrolyse der Acylcarnitine mit 1,5 ml einer 2 N methanolischen KOH (Herstellung: 11,22 g KOH in 1o ml Aqua dest. lösen, mit Methanol ad 1oo ml) versetzt und eine Stunde bei Zimmertemperatur belassen.
Im Rotationsverdampfer engt man das mit 2 N HCl auf pH 4-6 angesäuerte Hydrolysat bis zur Trockne ein.
Der Rückstand wird mit 3 ml Butanol (wassergesättigt) und 2 ml Aqua dest. gelöst und in ein Schliffglas gegossen. Anschließend wird der Kolben mit 1 ml Butanol und 1 ml Aqua dest. gespült, die Lösung eine Minute ausgeschüttelt und die wässrige Lösung im Zentrifugenglas 5 Minuten bei 3ooo U/min abzentrifugiert. Das Butanol wird quantitativ abge-

hoben und nochmals mit 2 ml Aqua dest. ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wird das Butanol abgehebert, die wässrigen Phasen vereinigt und gemischt. Davon dampft man 4 ml in einem kleinen Kolben zur Trockne ein und löst den Rückstand erneut in 4 ml Aqua dest.

3.2 Reagentien

(1) DTP (4,4'-Dithiodipyridin)
(2) Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4
(3) Äthylendiamin-tetraacetat, EDTA-Na_2H_2, p. a.
(4) Acetyl-Coenzym A, AcCoA
(5) Carnitinacetyltransferase (CAT)

3.4 Herstellung der Lösungen

(1) 4,4'-DTP, 1o mMol/l (22,o3 mg in 1o ml Äthanol)
(2) KH_2PO_4-Puffer, o,1 Mol/l, pH 7,2 (1,36 g KH_2PO_4 in 6o ml Aqua dest; mit 1 N KOH auf pH 7,2; mit Aqua des ad 1oo ml)
(3) EDTA, 5o mMol/l (o,46 g EDTA in 2o ml Aqua dest; mit 1 N KOH auf pH 7,2; mit Aqua dest. ad 25 ml)
(4) AcCoA, 1o mMol/l (Herstellung nach STADTMAN (43), Gehaltsbestimmung arsenometrisch)
(5) CAT, 1 mg/ml (Verdünnung 1 : 4 mit KH_2PO_4, o,5 Mol/l, pH 7,5)

3.5 Bestimmungsansatz (in Anlehnung an PEARSON und Mitarbeite (35))

Meßstrahlung: 334 nm; Schichtdicke: 1 cm; Testvolumen: 2, ml; Temperatur: 17°C (konstant); Messung gegen Luft.

In die Küvette:		Konz. im Test:
Probe (enteiweißt, neutral)	bis 1,6o ml	3 - 4o /uMolCarn./l
Phosphatpuffer	o,2o ml	1oo mMol/l
DTP-Lösung	o,o2 ml	o,1 mMol/l
AcCoA-Lösung	o,o2 ml	o,1 mMol/l
EDTA-Lösung	o,o5 ml	1,25 mMol/l
mischen; E_1 registrieren		
Carnitin-Acetyltransferase	o,o1 ml	o,o9 /uMol/ml = 4oo mU/ml

mischen; Extinktionszunahme bis zum Erreichen des Plateaus registrieren; erneute CAT-Zugabe (o,o1 ml) zur Ermittlung der Enzymeigenextinktion. Durch Extrapolation auf die Zeit O der ersten CAT-Zugabe wird E_2 bestimmt. Extrapolation der Extinktionszunahme nach der zweiten CAT-Zugabe auf deren Zeitpunkt ergibt E_3, die Eigenextinktion des Enzyms.

$E_3 - E_2 - E_1 =$ dE geht in die Berechnung ein.

3.6 Berechnung der Carnitinkonzentration

Die allgemeine Formel zur Berechnung der Konzentration (c) im enzymatischen Test lautet nach dem LAMBERT-BEERschen Gesetz:

$$c = \frac{dE}{\varepsilon \times d}$$

Konzentration (c) in nMol/ml
Extinktionskoeffizient (ε) in $cm^2\ Mol^{-1}$
Schichtdicke (d) in cm

Nach Einführung des Testvolumens (V) in ml und dem Probenvolumen (v) in ml ergibt sich:

$$c = \frac{dE \times V}{\varepsilon \times v \times d}$$

Im oben beschriebenen Test beträgt das Testvolumen 2 ml, die Schichtdicke 1 cm und das Probenvolumen bis zu 1,6 ml. dE ergibt sich aus der jeweiligen Messung, sodaß noch der Extinktionskoeffizient zu bestimmen bliebe.

Laut Tabelle 2 beträgt der Extinktionskoeffizient bei 334 nm für das 4-Mercaptopyridin $15{,}8 \times 10^3\ cm^2\ Mol^{-1}$, der des DTP bei der gleichen Wellenlänge $0{,}25 \times 10^3\ cm^2\ Mol^{-1}$.

Der wahre Extinktionskoeffizient (ε') errechnet sich aus dem gemessenen Extinktionskoeffizienten des Mercaptopyridins ($\varepsilon^{334}_{MTP} = 15{,}8 \times 10^3\ cm^2\ Mol^{-1}$) und der Eigenextinktion des DTP bei dieser Wellenlänge ($\varepsilon^{334}_{DTP} = 0{,}25 \times 10^3\ cm^2\ Mol^{-1}$). Er beträgt somit $16{,}05 \times 10^3\ cm^2\ Mol^{-1}$.

Der Versuch einer enzymatischen Bestimmung des Koeffizienten mittels einer Carnitin-Eichlösung bekannter Molarität ergab nach 20 Messungen einen Koeffizienten von $16{,}05 \times 10^3\ cm^2\ Mol^{-1}$.

Die Carnitinkonzentration im Test wird also nach folgender Formel bestimmt:

$$c = \frac{V \times dE}{\varepsilon_{MTP}^{334} \times v}$$

oder bei einem Testvolumen von 2 ml und v ml Probenvolumen unter Berücksichtigung der Verdünnung der Probe durch Vorbehandlung:

$$c = \frac{2000 \times 5 \times dE}{15{,}93 \times v} \text{ nMol/ml.}$$

3.7 Präzision der Methode

Mittels einer Carnitin-Eichlösung (0,2 mMol/l) wurden folgende Messungen durchgeführt:

(1) 7 Messungen mit 0,05 ml der Lösung (0,01 µMol Carnitin): 0,205 ± 0,01 mMol/l ($\bar{x} \pm s$); Variationskoeffizient 4,8%
(2) 5 Messungen mit 0,10 ml der Lösung (0,02 µMol Carnitin): 0,199 ± 0,004 mMol/l ($\bar{x} \pm s$); Variationskoeffizient 1,8%
(3) 7 Messungen mit 0,20 ml der Lösung (0,04 µMol Carnitin): 0,204 ± 0,004 mMol/l ($\bar{x} \pm s$); Variationskoeffizient 1,8%

3.8 Störquellen im Testsystem

Die Temperatur ist auf 17°C konstant zu halten, da sich sonst Extinktionsanstiege durch die Spontanhydrolyse des Acetyl-CoA bemerkbar machen.

Aufgrund der im biologischen Material vorkommenden Inhibitoren (11) empfiehlt es sich, die eingesetzte Carnitinmenge nicht zu groß zu wählen. Man sollte bei Muskelextrakten 0,02 ml nicht unter- und 0,1 ml nicht überschreiten. Unter dieser Kautele läßt sich die Carnitinkonzentration mit einem Variationskoeffizienten von 3% ermitteln.

3.9 Vorteile der neuen Methode

Die bisher benutzte enzymatische Bestimmungsmethode mit dem Indikator DTNB hat den Nachteil, daß DTNB das Enzym langsam inaktiviert. Dadurch können sich, wie die Autoren schon erwähnen, zu niedrige Carnitinkonzentrationen ergeben.

Wir untersuchten die Inaktivierung des Enzyms (CAT) in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur im Testansatz nach PEARSON und TUBBS (s. 3.5), der DTNB als Indikator in einer Konzentration von o,1 mMol/l und Carnitin in einer Konzentration von o,o2 nMol/l enthielt. Es ergab sich, daß der Substratumsatz bei 1o°C vollständig erfolgt, da der zu erwartende Extinktionswert (E_2), wenn auch erst nach längerer Zeit (ca. 1o min), erreicht wird. Eine Inaktivierung des Enzyms während des Reaktionsablaufes ist nicht nachweisbar. Bei 35°C war jedoch trotz mehrmaliger Enzymzugabe kein quantitativer Umsatz mehr zu registrieren; der zu erwartende Extinktionswert (E_2) wurde nicht erreicht. Aus dem geringeren Extinktionsendwert nach der ersten Enzymzugabe ließ sich ableiten, daß nur etwa 75% des Carnitin umgesetzt wurde. Im Gegensatz hierzu erlaubt die DTP-Methode im oben beschriebenen Testansatz noch bei 35°C einen 1oo %igen Umsatz.

Die Abbildung 4 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Enzymaktivität (nMol Substrat/min = mU) und der Temperatur. In Gegenwart von 4,4'-Dithiodipyridin nimmt die Aktivität des Enzyms mit steigender Temperatur erwartungsgemäß bis zum Temperaturoptimum von 35°C zu. In Gegenwart von DTNB

nimmt die Aktivität des Enzyms oberhalb von 2o°C kontinuierlich ab.

Diese Befunde legen den Schluß nahe, daß DTNB mit funktionell wichtigen SH-Gruppen des Enzyms reagiert, und zwar um so rascher, je höher die Reaktionstemperatur gewählt wird. Der neue Indikator, das 4,4'-Dithiodipyridin, scheint jedoch gegenüber den SH-Gruppen der CAT weniger reaktiv zu sein, da eine Inaktivierung bis zum Temperaturoptimum nicht nachweisbar ist.

Der pH-Bereich, in dem das DTP zur SH-Gruppenbestimmung eingesetzt werden kann, ist wesentlich breiter als der für das DTNB (DTP: pH 3,4 - 8,1; DTNB: pH 7,8 - 1o,4) (16, 25). Diese pH-Abhängigkeit der DTNB-Methode ist auf das entstehende Anion zurückzuführen. Nach SMITH und Mitarbeitern (4o) sind alle Reaktionen von Disulfiden mit Mercaptanen durch das entstehende Anion, das farbgebend ist, pH-abhängig.

Der um 18% höhere molare Extinktionskoeffizient von 4-Mercaptopyridin (bei 334 nm: 16,o5 x $1o^3$ cm^2 Mol^{-1}) gegenüber dem des p-Thionitrobenzoats (bei 412: 13,6o x $1o^3$ cm^2 Mol^{-1}), erlaubt eine empfindlichere Messung des Carnitin.

Eine Reaktionstemperatur von 17°C erweist sich als günstiger, da schon bei 21°C (empfohlene Reaktionstemperatur der DTNB-Methode) sich die Spontanhydrolyse des AcCoA störend bemerkbar macht. Sie steigt proportional zur Temperatur an und überlagert sich sowohl der Leerwertregistrierung als auch der Plateauphase, so daß Extinktionsabweichungen nach oben auftreten.

Als günstig erweist sich auch der niedrigere pH-Wert von 7,2 bei der DTP-Methode. Dadurch ist im Vergleich zur DTNB-Methode (pH 7,8) die Spontanhydrolyse des Acetyl-Coenzym A erheblich geringer.

Bezüglich der Einstellung des Gleichgewichtes haben wiederholte Messungen einer Carnitinlösung mit beiden Methoden ergeben, daß bei einer Testtemperatur von 2o^{o}C das Plateau eines Umsatzes von 1 nMol Carnitin/ 2 ml nach etwa 3,5 Minuten mit DTP als Indikator und nach 4,9 Minuten mit DTNB als Indikator erreicht war.

Eine Gegenüberstellung der diskutierten Kriterien beider Methoden zeigt Tabelle 3.

4. Der Carnitingehalt in der Muskulatur post mortem

4.1 Die Schweinemuskulatur als Modell

Da wir nur Muskulatur von menschlichen Leichen gewinnen konnten, mußten wir die Frage klären, ob sich in der Säugetiermuskulatur postmortale Veränderungen des Carnitingehaltes ergeben. Als Modell wählten wir Schweinemuskulatur.

Von 5 Schweinen wurden auf dem Schlachthof nach der Tötung Muskelproben von ca. 1o Gramm entnommen und unmittelbar bei $-4^{o}C$ gelagert. Jeweils 1 Gramm der Proben wurde sofort aufgearbeitet und der Carnitingehalt unmittelbar nach der Tötung ermittelt. In Abständen von 24 bis 48 Stunden wurden dann in allen 5 Muskelproben erneut Carnitinbestimmungen durchgeführt.

Auch am menschlichen Muskel wurde der Verlauf der Carnitinkonzentration in Proben, die bei $-4^{o}C$ gelagert wurden, überprüft. Nur wurde hier die Muskelprobe im Mittel erst 19 Stunden post mortem entnommen. Die Leichen waren direkt post mortem in die Pathologie überführt worden und bis zur Sektion im Kühlraum bei $-4^{o}C$ aufbewahrt.

4.2 Auswahl der menschlichen Muskelproben

Die Carnitinbestimmung erfolgt in Gewebsstücken von etwa 1 Gramm aus der Skeletmuskulatur (M. deltoideus, m. pectoralis maior, m. psoas maior, m. quadriceps femoris, m. sternocleidomastoideus), aus dem Myokard des linken Ventrikels und des linken Atriums. Die Auswahl erfolgte aus dem laufenden Sektionsgut. Der Tod lag im Durchschnitt 19 Stunden zurück; die Leichen wurden post mortem in der Pathologie bei $-4^{o}C$ aufbewahrt.

Ein Teil der Proben wurde bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet, so daß eine Konzentrationsangabe pro Gramm Feucht- und Trockengewicht möglich war.

5. Statistische Auswertung

Die Meßdaten wurden nach bestimmten Kriterien in Gruppen zusammengefaßt und in diesen Gruppen der Mittelwert ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s) bestimmt. Der Stichprobenumfang (n) wird jeweils angegeben.

Der Variationskoeffizient (VK) wird aufgeführt. Er zeigt die Standardabweichung in Prozent vom Mittelwert.

Der Vergleich von Versuchsgruppen erfolgt nach dem t-Test nach STUDENT (37). Als signifikant wird der Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit 1% ($p < 0{,}01$) beträgt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% gilt mit $0{,}05 > p > 0{,}01$ als statistisch auffällig.

Für die Ergebnisse des statistischen Vergleichs nach dem t-Test erscheint in der Tabelle oder Abbildung und im Text das Symbol "p" mit der entsprechenden Sicherungsgrenze.

Die Computer-Histiogramme zeigen die Mittelwerte der einzelnen Stichproben mit dem zugehörigen Vertrauensbereich auf dem 95% Niveau. Jede Stichprobe wird durch den Stichprobenumfang (n) charakterisiert.

C. Ergebnisse

1. Post-mortale Veränderungen des Carnitingehalts

Da uns nur Muskulatur menschlicher Leichen zur Verfügung stand, war es nötig abzukären, ob sich der Carnitingehalt nach dem Tode, zumindest im Zeitraum vom Eintritt des Todes bis zur Sektion, verändert.

Wir untersuchten zunächst einmal menschliche Muskulatur. Es ergibt sich, daß zwischen der ersten Entnahme nach 19 Stunden und dem 8. Tag post mortem keine Veränderungen des Carnitingehalts festzustellen sind (Abb. 5).

Um den Zeitraum vom Eintritt des Todes bis zur Entnahme der Muskelproben in der Pathologie (19 Stunden post mortem) abzuklären, benutzten wir Schweinemuskulatur: unmittelbar nach der Tötung im Schlachthof sowie nach 24, 51, 72 und 144 Stunden. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 6.

Danach bleibt der Gesamtgehalt an Carnitin in der Muskulatur in den untersuchten 6 Tagen nach der Tötung konstant.

2. Der Carnitingehalt verschiedener Skeletmuskeln des Menschen

An insgesamt 8o Muskelproben der Musculi deltoideus, pectoralis maior, psoas maior, sternocleidomastoideus und quadriceps femoris untersuchten wir den Carnitingehalt. Die Muskelproben stammen von 34 Leichen.

Bezieht man den Carnitingehalt auf das Feuchtgewicht, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Muskeln. Im Mittel beträgt der Carnitingehalt (Anmerkung: es handelt sich bei allen Konzentrationsangaben um das extrahierte Gesamtcarnitin) 3,9 $\pm$ o,8 /uMol/Gramm Feuchtgewicht (Abb. 7). Bezogen auf das Trockengewicht ergibt sich

aber ein statistisch auffälliger Unterschied zwischen dem Musculus deltoideus einerseits und den Musculi psoas maior und pectoralis maior andererseits. Der Gehalt des Musculus deltoideus von 18,9 ± 3,5 /uMol Carnitin/Gramm Trockengewicht liegt über dem der beiden letztgenannten Muskeln, deren Gehalt im Mittel 15,9 /uMol Carnitin/Gramm Trockengewicht ausmacht. Diese Differenz ist nach dem t-Test "statistisch auffällig" (o,o5 p o,o1) (Abb. 8).
Für alle 3 Muskeln ergibt sich ein Mittelwert von 16,8 ± 3, /uMol Carnitin/Gramm Trockengewicht. Die Gesamtmittelwerte weisen sowohl in bezug auf das Feucht- als auch auf das Trockengewicht eine Streuung von 21% auf.

3. Der Carnitingehalt im menschlichen Myokard

An insgesamt 52 Muskelproben aus dem Myokard des linken Atriums und Ventrikels untersuchten wir ebenfalls den Carnitingehalt. Die Proben entstammen 29 Leichen.
Der linke Ventrikel liegt mit einem Carnitingehalt von o,9 ± o,3 /uMol/Gramm Feuchtgewicht und 4,18 ± 1,5 /uMol/Gramm Trockengewicht weit über dem des linken Atrium. Hier beträg der Carnitingehalt o,47 ± o,2 /uMol/Gramm Feuchtgewicht und 1,43 ± o,5 /uMol/Gramm Trockengewicht. Der Konzentrationsunterschied ist statistisch signifikant (Tab. 4).

4. Der Carnitingehalt im linken Ventrikel unter normalen und pathologischen Verhältnissen

Die Carnitinkonzentrationen im linken Ventrikel unterliegen stärkeren Schwankungen. Die Streuung beträgt 35%. Es entsta

die Frage, ob diese großen Schwankungen sich mit pathologisch-anatomischen Besonderheiten korrelieren lassen.

Als Bezugswert wählten wir den Mittelwert von Proben, die aus Herzen gewonnen wurden, deren Gewicht im Bereich der Norm lag (35o g) und bei deren Spendern der Tod klinisch und pathologisch-anatomisch nicht auf ein unmittelbares Herzversagen zurückzuführen war (s. Tabelle 6).

Unter der Bezeichnung "hypertrophiert" werden die Ventrikel mit entsprechender pathologischer Diagnose zusammengestellt. Während der Gehalt im normalen Ventrikel 1,18 ± o,3 /uMol/ Gramm Feuchtgewicht beträgt, fanden sich im hypertrophierten Ventrikel nur noch o,85 ± o,2 /uMol Carnitin/Gramm Feuchtgewicht. Dieser Konzentrationsunterschied ist auch bezogen auf das Trockengewicht festzustellen. Hierbei steht ein Gehalt von im Mittel 5,99 /uMol/Gramm Trockengewicht im normalen Ventrikel einem Gehalt von nur noch 4,1 /uMol/Gramm Trockengewicht im hypertrophierten Ventrikel gegenüber. Der Konzentrationsverlust beträgt im Durchschnitt 3o%.

Schlüsselt man die Hypertrophie nach dem Herzgewicht auf, so ergibt sich für die "leichte" Hypertrophie mit einem Herzgewicht von 38o bis 5oo Gramm im Mittel noch eine Konzentration von 1,16 /uMol Carnitin/Gramm Feuchtgewicht, bzw. 5,22 /uMol Carnitin/Gramm Trockengewicht. Das liegt im Normbereich. Wird jedoch das kritische Herzgewicht von 5oo Gramm überschritten ("schwere" Hypertrophie), so beträgt der Carnitingehalt nur noch o,72 ± o,2 /uMol/Gramm Feuchtgewicht oder 3,37 ± 1,o /uMol/Gramm Trockengewicht. Das bedeutet eine Abnahme um durchschnittlich 41% gegenüber dem Normwert.

Faßt man die pathologisch stark alterierten Ventrikel zu einer Gruppe zusammen, so findet sich im Mittel ein Carnitingehalt von o,53 /uMol/Gramm Feuchtgewicht und 2,74 /uMol/Gramm Trockengewicht. Das sind mit 45% im Mittel etwas weniger als die Hälfte des normalen Gehaltes. Es handelt sich um Ventrikel, die Schwielen, Narben, Infarkte oder Fibrosen aufweisen und unmittelbar zum Herztod geführt haben.
Es läßt sich folglich ein kontinuierlicher Konzentrationssturz über die Ventrikelhypertrophie unterschiedlichen Ausmaßes bis hin zu pathologischen Veränderungen mit akutem Herzversagen aufzeigen.
Dieser Carnitinverlust fällt in bezug auf die Extrema (normaler Ventrikel - pathologisch veränderter Ventrikel) statistisch signifikant aus; er ist in den Zwischenstadien aber zumindest statistisch auffällig. Die genauen Ergebnisse der t-Tests und eine Aufstellung der Werte sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Der Mittelwert aller Ventrikelproben weist eine Streuung von 35% auf. Die oben durchgeführte Unterteilung in verschiedene Gruppen (normale, hypertrophierte, pathologisch alterierte Ventrikel) erlaubt eine Reduzierung der Streuung auf im Mittel 2o%.
Das Atrium sinistrum scheint sich an diesen Änderungen nicht signifikant zu beteiligen. Wie die Tabelle 7 zeigt, liegen die Werte aus Atrien normaler Herzen mit im Mittel o,48 /uMol Carnitin/Gramm Feuchtgewicht und 1,46 /uMol Carnitin/Gramm Trockengewicht gegenüber denen hypertrophierter Herzen mit o,38 /uMol Carnitin/Gramm Feuchtgewicht und 1,39 /uMol Carnitin/Gramm Trockengewicht auf fast identischem Niveau.

5. Der Wassergehalt von Atrium und Ventrikel

Die Analyse des Wassergehaltes von Atrium und Ventrikel ergibt für die Vorhofmuskulatur im Mittel 72,3% und für die Ventrikelmuskulatur 8o,2%. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < o,o1$).

Bei der Ventrikelmuskulatur schlüsselten wir noch zwischen normal und hypertrophiert auf. Dabei zeigte sich, daß der hypertrophierte Ventrikel mit 21,8 ± 2,7% einen höheren Anteil an Trockensubstanz als der normal belastete Ventrikel mit 18,3 ± 1,7% hat. Nach dem t-Test ist die Differenz mit $p < o,o2$ statistisch auffällig.

Der Vorhof zeigt für hypertrophierte und normale Herzen fast identische Werte (27,2 ± 5,4% / 25,6 ± 6,1%).

6. Vergleich der Myokard- und Skeletmuskulatur

Der Gesamtmittelwert der Skeletmuskulatur beträgt bezogen auf das Feuchtgewicht 3,9 ± o,8 /uMol Carnitin und bezogen auf das Trockengewicht 16,8 ± 3,7 /uMol Carnitin.

Der Gesamtmittelwert der Ventrikelmuskulatur beläuft sich auf o,9 ± o,3 /uMol/Gramm Feuchtgewicht und 4,18 ± 1,5 /uMol/Gramm Trockengewicht.

Der Vergleich zwischen beiden Wertepaaren nach dem t-Test erbringt einen statistisch signifikanten Unterschied, wie aus der Tabelle 5 zu ersehen ist.

Der Mittelwert der Vorhofmuskulatur liegt mit o,47 ± o,2 /uMol Carnitin/Gramm Feuchtgewicht und 1,43 ± o,5 /uMol Carnitin/Gramm Trockengewicht ebenfalls signifikant unter dem Gesamtmittelwert der Skeletmuskulatur, wie auch der Ventrikelmuskulatur (s. C.3.).

7. Die Altersabhängigkeit des Carnitingehaltes der Muskulatur

Die Altersabhängigkeit der Carnitinkonzentration in Skelet- und Herzmuskel wurde ebenfalls untersucht. Es wurden Proben von Totgeburten, Kindern und Erwachsenen des laufenden Sektionsgutes analysiert.

Der Carnitingehalt der Skeletmuskulatur erfährt mit zunehmendem Alter eine Steigerung. Er liegt bei Totgeburten mit o,54 ± o,1 /uMol/Gramm Feuchtgewicht signifikant unter dem Gehalt der Skeletmuskulatur von Kindern der Altersgruppe 1 bis 7 Jahren mit 2,3 ± o,7 /uMol/Gramm Feuchtgewicht. Der prozentuale Zuwachs beträgt 318%.

Bei Erwachsenen zwischen 18 und 87 Jahren liegt die Konzentration im Untersuchungsmaterial bei 3,9 ± o,9 /uMol/Gramm Feuchtgewicht, mithin signifikant über dem Gehalt der Skeletmuskulatur von Kindern. Der prozentuale Zuwachs beträgt hier noch 74%.

Der Carnitingehalt des Myokards des linken Ventrikels läßt ebenso einen Anstieg mit zunehmendem Alter nach der Geburt erkennen, wenn dieser auch aufgrund des kleinen Stichprobenumfanges zwischen Totgeburten und Kindern nicht signifikant ausfällt.

So liegt die Ventrikelkonzentration von Totgeburten im Mittel bei o,5 /uMol/Gramm, die von Kindern beo o,7 /uMol/Gramm und die der Erwachsenen bei 1,18 /uMol/Gramm. (Anmerkung: Es wurden nur die normalen Ventrikel zur Errechnung des Mittelwertes herangezogen.) Nach dem t-Test ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration im Myokard von Totgeburten und Kindern gegenüber dem Erwachsenen-

kollektiv. Der Konzentrationszuwachs beträgt zwischen Totgeburten und KIndern bezogen auf die Mittelwerte 45%, zwischen Kindern und Erwachsenen 6o%. Eine Gegenüberstellung der Werte zeigt die Abbildung 9.

8. Geschlechtsunterschiede der Carnitinkonzentration

Wie aus der Tabelle 8 hervorgeht, besteht bezüglich der Carnitinkonzentration in der Skeletmuskulatur und im Myokard von männlichen und weiblichen Personen kein statistisch signifikanter Unterschied. Ein Geschlechtsunterschied ist mit der benutzten Methode nicht nachweisbar. (Anmerkung: Der sich anhand der Mittelwerte der Carnitinkonzentration im linken Ventrikel ergebende Unterschied erklärt sich durch eine größere Zahl an pathologisch veränderten Ventrikeln auf Seiten der weiblichen Personen. Er ist statistisch nicht signifikant.)

9. Carnitin bei einigen ausgewählten Grundleiden und Todesursachen

Auch bei den untersuchten Diabetikern, die sich im laufenden Sektionsgut befanden, konnte bezüglich des Carnitingehalts in der Skeletmuskulatur und im Myokard kein signifikanter Unterschied zum Normalkollektiv festgestellt werden (Tab. 9).

Bei der Auswertung der Skeletmuskelwerte fielen einige sehr hohe Carnitinwerte auf. Bei der Analyse der Todesursache dieser Fälle ergab sich folgendes: Der Gehalt der Skeletmuskulatur von Patienten, die an einem Tumor verstorben sind, liegt bezogen auf das Feuchtgewicht bei 4,25 $\pm$ o,6 /uMol/

Gramm und bezogen auf das Trockengewicht bei 19,2 ± 2,7 /uMol/Gramm. Die Differenz liegt im Mittel signifikant über den Werten des Normalkollektivs (Tab. 1o). Der prozentuale Zuwachs bei Tumorpatienten beläuft sich im Bezug auf das Trockengewicht auf 28,3%. Dieser Unterschied der Gesamtcarnitinkonzentration konnte im Myokard nicht festgestellt werden.

D. Diskussion

Der Gehalt an Gesamtcarnitin unterliegt in den ersten 8 Tagen post mortem keinen meßbaren Veränderungen (Abb. 5 und 6), wie die Bestimmung in Skeletmuskulatur von menschlichen Leichen und - im Modellversuch - von Schweinen erbrachte.
Es ist aber bekannt, daß kurz nach Eintritt des Todes eine Hydrolyse der Carnitinester, v. a. des Acetylcarnitins, aber auch der längerkettigen Acylcarnitine einsetzt (34). Diese Hydrolyse beeinflußt die Bestimmung des Gesamtcarnitins jedoch nicht, da Carnitin im beobachteten Zeitraum offensichtlich nicht abgebaut wird.
In Abhängigkeit von den Umgebungsfaktoren (Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit) (38) trocknet die Muskulatur post mortem unterschiedlich stark aus, was zu post-mortalen Veränderungen der Carnitinkonzentration in bezug auf das Feuchtgewicht führen kann. Die Lagerung im Kühlhaus bei - 4°C reduzierte im Untersuchungszeitraum den Wasserverlust derart, daß er auf die post-mortalen Gehaltsbestimmungen keinen nennenswerten Einfluß hatte.

Der Carnitingehalt der Muskulatur setzt sich aus dem freien Carnitin, den kurzkettigen und langkettigen Acylcarnitinen zusammen. Wir bestimmten in der menschlichen Skeletmuskulatur das Gesamtcarnitin in einer Konzentration von 16,8 $\pm$ 3,7 /uMol/Gramm Trockengewicht. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse über Carnitinkonzentrationen im menschlichen Skeletmuskel stammen von CEDERBLAD und LINDSTEDT, die in intraoperativ entnommenen Muskelbiopsien (ohne Nennung der anatomi-

schen Lokalisation) einen Gehalt von 12,8 ± 2,9 /uMol/Gramm Trockengewicht freies Carnitin und kurzkettige Acylcarnitine angeben (12). Die Differenz der beiden Ergebnisse beträgt bezogen auf das Gesamtcarnitin 24% und erklärt sich durch die von CEDERBLAD und LINDSTEDT nicht bestimmten langkettigen Acylcarnitine.
Konzentrationsanalysen im Rattenmuskel (35) erbrachten für Carnitin und seine Verbindungen im Mittel folgende Werte: Gesamtcarnitin o,46 /uMol/Gramm Feuchtgewicht; freies Carnitin und kurzkettige Acylcarnitine o,38 /uMol/Gramm Feuchtgewicht; langkettige Acylcarnitine o,o8 /uMol/Gramm Feuchtgewicht. Auf die langkettigen Acylcarnitine entfallen im Rattenmuskel 18% des Gesamtcarnitins. Dieser Prozentsatz ist unter Berücksichtigung der Streuung der angegebenen Konzentrationen und den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden in seiner Größenordnung vergleichbar dem Prozentsatz der langkettigen Acylcarnitine am Gesamtcarnitin im menschlichen Muskel von 24%.

Im Vergleich zu den Tierspezies Ratte und Maus, die einen Carnitingehalt von 3,o ± o,9 /uMol/Gramm Trockengewicht (Ratte) und 1,7 ± o,3 /uMol/Gramm Trockengewicht (Maus) aufweisen, liegt der Carnitingehalt der menschlichen Muskulatur mit 12,8 ± 2,9 /uMol/Gramm Trockengewicht ungleich höher.-
Die quergestreifte Skeletmuskulatur unterteilt sich in 3 verschiedene Fasertypen (33); nämlich in weiße und rote Fasern und in einen Intermediärtyp, der bezüglich seiner Enzymausstattung eine Mittelstellung zwischen den zwei Erstgenannten einnimmt. Untersuchungen über die Stoffwechsellage in den

genannten Fasertypen haben gezeigt, daß die weißen Fasern fast ausschließlich ihre Energie über die anaerobe Glycolyse decken, während die roten einen bedeutenderen oxidativen Stoffwechsel haben (26).

Nun unterscheiden sich Ratten und Mäuse in der Zusammensetzung ihrer Skeletmuskulatur kaum (33). Beide Spezies enthalten in den zur Carnitinbestimmung herangezogenen Muskeln fast nur weiße Fasern. Die menschliche Skeletmuskulatur stellt einen Mischtyp dar, in dem alle 3 Fasertypen nebeneinander vorkommen (33), und in allen 3 Fasertypen sind die oxidativen Enzyme in höherer Aktivität enthalten. Daher ist im Gegensatz zu den beiden Tierspezies in der menschlichen Muskulatur keine klare Typendifferenzierung möglich.

Man könnte den höheren Carnitingehalt der menschlichen Muskulatur als Ausdruck eines stärkeren Fettstoffwechsels und der damit zusammenhängenden höheren Aktivität oxidativer Enzyme verstehen. Die Fettsäure-Oxidation ist bedeutender, und es entsteht über ein hohes Angebot an Acetyl-CoA ein "Acetyl-pressure" (42), das Einfluß auf die Fließgleichgewichtseinstellung der CAT-Reaktion hat.

Diese Erklärung wurde bei Carnitinanalysen der Schafsmuskulatur von SNOSWELL und KOUNDAKJIAN (42) diskutiert. In alloxandiabetischen Schafen stellten sie eine verstärkte Acetyl-CoA-Bildung fest, die mit einer erheblichen Konzentrationserhöhung des Gesamtcarnitins einherging.

Die Carnitinkonzentration im Myokard unterscheidet sich bei Ratte, Maus und Mensch nicht erheblich (Tab. 11).

Die Herzmuskulatur nimmt in diesem Zusammenhang eine Sonder-

stellung ein. Sie ist in den angesprochenen Spezies identisch aufgebaut und weist eine zumindest ähnliche enzymatische Ausstattung auf.

In den beiden Tierspezies weist die Herzmuskulatur einen höheren Carnitingehalt auf als die Skeletmuskulatur. Das Myokard deckt seine energetischen Bedürfnisse unter basalen Verhältnissen zu 35% durch Kohlenhydratabbau, zu 5% durch Ketone und Aminosäuren, sowie zu 60% durch Fett. Die Hauptenergie für die Creatinphosphat- und ATP-Resynthese im Skeletmuskel stammt vom Kohlenhydratabbau zu Kohlendioxyd und Wasser (26). Über diese unterschiedliche Bedeutung des Fettsäurestoffwechsels erscheint das Verhältnis der Carnitinkonzentration von Myokard zu Skeletmuskulatur bei den zwei Tierspezies erklärbar. Eine bedeutendere Fettsäure-Oxidation im Myokard macht die Bereitstellung größerer Carnitinmengen zur Ausschleusung der Acetyl-CoA-Gruppen aus den Mitochondrien erforderlich. Das Enzymmuster beider Muskeltypen unterstreicht die unterschiedliche Bedeutung der Stoffwechselwege. Die Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels prädominieren im Myokard, während sie in der Muskulatur gegenüber denen des Kohlenhydratstoffwechsels zurücktreten (6). Auch enthält der Herzmuskel im Vergleich zum Skeletmuskel ungleich mehr Mitochondrien, in deren Membran der Carrier Carnitin wirksam wird.

Das Verhältnis der Carnitinkonzentration im Myokard zur Skeletmuskulatur fällt beim Menschen im Gegensatz zu den Tierspezies erstaunlicherweise umgekehrt aus: Der Gehalt der Skeletmuskulatur liegt weit über dem der Herzmuskulatur. Eine mögliche Erklärung ist durch eine unterschiedliche Turn-over-Zeit des Carnitins gegeben. Ebenso wie die Turn-over-Zeit des

Carnitins beim Fasten und im Diabetes mellitus sich durch das höhere Angebot an freien Fettsäuren im Muskel verringert, könnte sie im Myokard bei einem schon unter physiologischen Bedingungen höheren Umsatz freier Fettsäuren mit stärkerer ß-Oxidation kürzer sein als in der Skeletmuskulatur. Die freien Fettsäuren werden nach Eintritt in die Zelle der mitochondrialen ß-Oxidation zugeführt, deren oxidative Enzyme im Herzmuskel in besonders hoher Aktivität vorliegen. Carnitin transportiert hier zunächst über die CPT-Reaktion die Acyl-CoA-Verbindungen durch die Mitochondrienmembran. Innerhalb der Mitochondrien ist Carnitin wiederum erforderlich; denn über die CAT-Reaktion kommunizieren zwei mitochondriale Verteilungsräume für Acetyl-CoA. Es handelt sich dabei einmal um das Acetyl-CoA aus der ß-Oxidation und andererseits um das aus dem Pyruvatabbau (26).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich menschliche und tierische Skeletmuskulatur in der Zusammensetzung aus verschiedenen Muskelfasertypen und in der Bedeutung der oxidativen und anaeroben Stoffwechselwege unterscheiden.

Wir fanden einen signifikanten Konzentrationsunterschied im Myokard zwischen Vorhof- und Ventrikelmuskulatur. Der Unterschied läßt sich möglicherweise durch die größere Druckentwicklung und einer damit verbundenen größeren mechanischen Arbeit des Ventrikels gegenüber dem Vorhof erklären. Proportional mit der erbrachten Leistung ändert sich der Energiebedarf, der im Myokard vorwiegend durch Verarbeitung freier Fettsäuren gedeckt wird. Die ß-Oxidation wird zur Energieversorgung in der Ventrikelmuskulatur prozentual mehr beitragen

als im Vorhof.

Mit zunehmender Hypertrophie des linken Ventrikels ergab sich folgende Veränderung des Carnitingehaltes: Bis zum kritischen Herzgewicht von 5oo Gramm ist noch keine signifikante Konzentrationsabnahme zu verzeichnen. Geht der Grad der Hypertrophie über die Grenze von 5oo Gramm hinaus, so fällt die Carnitinkonzentration gegenüber der Norm ab. Noch bedeutender ist die Konzentrationsabnahme im pathologisch stark veränderten Ventrikel.
Bei der Hypertrophie der Herzmuskelzellen stellt die ungenügende Capillarisierung den limitierenden Faktor für die Versorgung dar. Die Volumenzunahme der Zellen führt oberhalb des kritischen Herzgewichtes zu einer Mangelversorgung. Sowohl Sauerstoff als auch alle mit dem Blut herangeführten Substanzen können nicht mehr ausreichend in die Zellen eindringen. Die Diffusionsstrecke wird zu groß. Es folgt eine funktionelle Minderleistung der Herzmuskelzellen, die sich morphologisch u. a. in einer Mitochondrienschwellung bemerkbar macht. Eine mögliche Konsequenz der funktionellen Beeinträchtigung des zellulären Stoffwechsels könnte der Konzentrationsverlust an Carnitin sein.
Bei bestehender Coronarsklerose und Minderdurchblutung des Myokards, die im Endeffekt zu einer Fibrosierung und zum Infarkt führen, reichen die Konzentrationen der herangeführten Substanzen nicht mehr zur Versorgung der Zellen aus. Der Energiemangel macht sich in der Endstrombahn durch Zellverfettung bemerkbar (histologisch als "Tigerung des Herzmuskels" bekannt). Es ist auch hier mit einer Ab-

nahme der zellulären Carnitinkonzentration zu rechnen.

Dank der geringen Toxizität des Carnitins (LD_{50} acuta beläuft sich auf 13,5 mg/Gramm Körpergewicht bei Mäusen (36)) wäre in diesen Fällen neben einer Verbesserung der coronaren Durchblutung die therapeutische Substitution zur Regulierung des Gehaltes an Carnitin zu überdenken.

Es ergibt sich bei der Durchsicht des prozentualen Anteils der Trockensubstanz an Ventrikel- und Vorhofmuskulatur, daß letztere einen höheren Anteil aufweist. Diese Differenz läßt sich durch einen höheren Gehalt an elastischen und kollagenen Fasern im Vorhof erklären (5).
Weiter zeigte sich eine Zunahme des Anteiles an Trockensubstanz in hypertrophierten Ventrikeln. Die Steigerung ist nach SANDRITTER und BENEKE (38) durch eine Zunahme an DNS, RNS und Proteinen bei Hypertrophie bedingt.
Der Vorhof scheint an den strukturellen Veränderungen bei der Hypertrophie nicht beteiligt zu sein, da sich das Trockengewicht und auch der Carnitingehalt nicht signifikant gegenüber der Norm verändern.

Der Carnitingehalt der Skeletmuskulatur erfährt von der Geburt zum Erwachsenenalter eine Steigerung. Er liegt bei Totgeburten bei o,54 /uMol/Gramm Feuchtgewicht, bei Kindern der Altersgruppe 1 bis 7 Jahren bei 2,3 /uMol/Gramm Feuchtgewicht und bei Erwachsenen zwischen 18 und 87 Jahren bei 3,9 /uMol/Gramm Feuchtgewicht. Diese Zunahme ist zu einem sehr geringen Prozentsatz durch Wasserverlust mit

steigendem Alter bedingt, obwohl wir in diesem Fall die Carnitinkonzentration in bezug auf das Feuchtgewicht bestimmten. In der Literatur (7) findet man folgende Angaben über den Wassergehalt der Gewebe: auf Feten entfallen 74,1% Wasser/1oo Gramm Gewebe, auf Kinder 73,4% und auf Erwachsene 65,9% Wasser/1oo Gramm Gewebe (Mittelwerte). Bezieht man nun den prozentualen Zuwachs der Carnitinkonzentration auf das Erwachsenenalter, so muß man die Konzentrationsangabe bei Totgeburten um 8,2% und bei Kindern um 7,5% gegenüber der der Erwachsenen reduzieren. Der prozentuale Anstieg bliebe aber trotzdem noch beachtlich. AUGENFELD und FRITZ fanden eine Zunahme der Aktivität der Carnitin-Palmityltransferase (CPT) und der ß-Oxidation in der Leber von fetalen und neonatalen Ratten, weiter eine Zunahme mit steigendem Alter. Die Autoren versuchen dieses Resultat durch Anpassung des Enzymmusters der Leberzelle an die angebotenen Substrate und Metaboliten zu erklären (3). Menschliche Feten wie auch Rattenfeten erhalten über den Placentarkreislauf vorwiegend Glucose, durch die der kalorische Bedarf gedeckt wird. Die Fettsäure-Oxidation ist zur Energiegewinnung zu diesem Zeitpunkt noch von untergeordneter Bedeutung. Die Aktivität der CPT in der fetalen Rattenleber ist sehr gering.- Unsere Resultate zeigen einen geringen Carnitingehalt der Skeletmuskulatur beim menschlichen Feten (Anmerkung: anstelle von Feten wurden Totgeburten untersucht, die aufgrund ihrer Ernährung den Feten gleichgestellt sind, da keine postnatale enterale Ernährung begonnen wurde).

Nach der Geburt werden den Säugern in größerem Maße enteral

Fette zugeführt, die durch eine nun vermehrt einsetzende Fettsäure-Oxidation verbraucht werden. AUGENFELD und FRITZ zeigten in ihrer Arbeit (3), daß die Fettsäure-Oxidation in der Leber u. a. von einem Carnitin-benötigendem Stoffwechselweg und der CPT-Aktivität abhängt. Beides, sowohl die CPT-Aktivität als auch die Carnitinkonzentration steigen von der Fetalperiode zum Kindesalter stark an.
Mit zunehmendem Alter nach der Geburt erlangt die Fettsäure-Oxidation ihre endgültige Aktivität im Intermediärstoffwechsel, so daß bei ausgewachsenen Organismen die Aktivität der CPT ihr Maximum erreicht und auch der Carnitingehalt seine für dieses Alter physiologische KOnzentration in der Muskulatur zeigt. Die Tabelle 12 stellt die CPT-Aktivität der Ratten-Leberzelle der Carnitinkonzentration der menschlichen Skeletmuskulatur in Abhängigkeit vom Alter gegenüber.

Im menschlichen Myokard (linker Ventrikel) zeigt die Carnitinkonzentration eine ähnliche Entwicklung, die jedoch nicht so hohe prozentuale Differenzen ergibt.
Totgeburten enthalten im linken Ventrikel im Mittel o,5 /uMol Carnitin/Gramm Feuchtgewicht, Kinder o,7 und Erwachsene 1,18 /uMol Carnitin/Gramm Feuchtgewicht. Ähnliche Ergebnisse bei der Ratte lagen schon vor (46).
Im Herzmuskel, der schon den fetalen Blutkreislauf aufrecht erhält, wird der Energiebedarf zu 6o% durch freie Fettsäuren gedeckt. Fakultativ kann auch Glucose verwertet werden. Wenn nun während der postnatalen Entwicklung mehr freie Fettsäuren angeboten werden, so stellt sich langsam das physiologische Verhältnis, d. h. Deckung des Kalorienbedarfs zu 6o% durch freie Fettsäuren und zu 3o% durch Glucose ein. Der immer

schon bedeutendere Fettstoffwechsel drückt sich in einer nur geringen Steigerung der Carnitinkonzentration mit zunehmendem Alter aus.

MEHLMAN und Mitarbeiter (32) untersuchten die Carnitinkonzentration im Gewebe von normalen, alloxan-diabetischen und insulinbehandelten Ratten. Er fand, daß in bezug auf die Gewebekonzentration von normalen Ratten die Carnitinkonzentration von unbehandelten alloxan-diabetischen Ratten um etwa 42% abfiel. Unter anschließender Insulinbehandlung wurden wieder Normalwerte erreicht. Der Abfall war durch einen gesteigerten Turn-over des Carnitins bedingt, der sich reaktiv auf das erhöhte Angebot an freien Fettsäuren im Diabetes mellitus einstellt.
Daher interessierte uns die Frage, ob sich die im Untersuchungskollektiv befindlichen Diabetiker in ihrer Carnitinkonzentration von der Norm unterscheiden würden ?
Von den untersuchten Diabetikern ist aber keiner im Coma diabeticum verstorben; der Blutzucker war in allen Fällen medikamentös eingestellt und abgesichert. Es konnte daher kein Konzentrationsunterschied gegenüber der Norm festgestellt werden.

Patienten, die an einem Tumorleiden verstarben, haben eine mit 4,25 /uMol/Gramm Feuchtgewicht und 19,2 /uMol/Gramm Trockengewicht höhere Carnitinkonzentration im Skeletmuskel als das Normalkollektiv.
G. COSTA schreibt in seiner Abhandlung über die Kachexie und den systemischen Effekt der Tumoren:

"Das Wachstum des Krebses in einem Menschen führt zu einer gravierenden Veränderung der Organe und Funktionen als Konsequenz der Zerstörung, deren Versuch zur Regeneration und Homöostase. Das Ergebnis ist das weit anerkannte aber wenig verstandene Syndrom, Kachexie genannt. Die Kachexie manifestiert sich in Form von Schwäche, Inappetenz und in der Umverteilung von Wirtskomponenten, Elektrolyten, hormonellen Entgleisungen und fortschreitendem Verlust vitaler Funktionen. Die Inappetenz ist allgemein das initiale Symptom eines wachsenden Tumors, dessen metastatische Absiedlungen im Darmtrakt mit sich daraus ergebender Malabsorption ein terminales Symptom darstellen und zum Hungerzustand des Wirtsorganismus führen" (15).

Untersuchungen über den Fettstoffwechsel bei Tumoren haben gezeigt, daß die freien Fettsäuren im Serum bemerkenswert erhöht sind, und daß das Muskelfett progressiv abgebaut wird (15). Weiterhin gehen auch Strukturfette verloren, die für die Unterteilung der Zellkompartimente und deren Partialfunktionen von Bedeutung sind. Damit entgleist der Zellstoffwechsel bis zum Zelluntergang.

Es ist schon länger bekannt, daß die meisten Tumoren ihre Energie mittels aerober Glycolyse erzeugen (39). Dem Organismus wird also ständig mehr Zucker entzogen, als es unter physiologischen Verhältnissen der Fall ist. Die Skeletmuskulatur, die bei geringer Belastung ihren energetischen Bedarf über Glucose deckt, muß bei reduziertem Blutzucker und hohem Angebot an freien Fettsäuren den Bedarf vermehrt über die Oxidation von Fettsäuren zu decken versuchen. Zu diesem Zweck müssen die Fettsäuren in die Mitochondrien transportiert werden.

SNOSWELL und HENDERSON (41) hatten 1970 schon gezeigt, daß im Hunger die Schafsleber mehr Carnitin enthält als bei normaler Ernährung. Sie führten das Phänomen ebenfalls auf ein erhöhtes Angebot an freien Fettsäuren zurück, die vermehrt metabolisiert werden müssen. Der Organismus unterliegt im Hunger damit einem erhöhten Acetyl-Druck, der in einer aktiveren ß-Oxidation begründet ist und der die enzymatische Transacetylierung mittels der Carnitin-Acetyltransferase und Carnitin Schritt halten muß. Die Autoren beschließen ihre Diskussion mit der Feststellung, daß der bemerkenswerte Anstieg des Gesamtcarnitins in der Schafsleber beim Fasten eine vermehrte Carnitinsynthese voraussetzt.

Hunger und Belastung des Organismus durch einen Tumor, besonders im Terminalstadium, stellen einen Stresszustand dar, der physiologischerweise zu einer verstärkten ACTH-Ausschüttung Anlaß gibt. ACTH seinerseits bewirkt an der Nebennierenrinde eine Ausschüttung von Glucocorticoiden, die z.B. in der Muskulatur zur Einsparung von Glucose und bei längerdauernder Einwirkung zu einem Muskelschwund führen. Am Fettgewebe wird eine verstärkte Lipolyse mit Anstieg der freien Fettsäuren im Serum bewirkt (27).

Kühe, die mit Glucocorticoiden behandelt wurden, zeigten einen Anstieg der Gesamtcarnitinkonzentration (4), was ebenfalls über das stärkere Angebot an freien Fettsäuren und Acetyl-CoA zu erklären ist.

Der menschliche Herzmuskel zeigt bei Tumorträgern keine Veränderung der Carnitinkonzentration, da er schon unter physiologischen Bedingungen seinen Energiebedarf hauptsächlich über freie Fettsäuren deckt.

E. Zusammenfassung

Der in die Indikatorreaktion der enzymatischen Nachweismethode eingeführte neue Indikator, das 4,4'-Dithiodipyridin, erlaubt eine Carnitinbestimmung ohne störende Einflüsse.

Konzentrationsbestimmungen mit der 4,4'-Dithiodipyridin-Methode erbrachten in menschlicher Muskulatur folgende Ergebnisse:

(1) die Carnitinkonzentration unterliegt in den ersten 8 Tagen post mortem keinen signifikanten Veränderungen;

(2) die Carnitinkonzentrationen in /uMol/Gramm Feuchtgewicht betragen für den menschlichen Skeletmuskel 3,93, den linken Ventrikel o,9o und das linke Atrium o,47 (Mittelwerte);

(3) die Konzentrationen im Skeletmuskel, Ventrikel und Atrium verhalten sich wie 8,36 : 1,91 : 1;

(4) die Carnitinkonzentrationen im Skeletmuskel und Ventrikel nehmen von der Fetalperiode über das Kindesalter bis hin in die Erwachsenenzeit zu;

(5) ein Geschlechtsunterschied der Carnitinkonzentration besteht weder in der Skeletmuskulatur noch im Herzmuskel;

(6) im Ventrikel steigt der Anteil der Trockensubstanz mit zunehmender Hypertrophie; das Atrium hat prozentual einen höheren Anteil an der Trockensubstanz als der Ventrikel;

(7) mit zunehmender Gewebsschädigung nimmt die Konzentration an Carnitin im Ventrikel ab; das gilt sowohl für die verschiedenen Grade der Hypertrophie als auch für starke Gewebsschäden, die die Todesursache darstellen; im letzten Falle erreicht die Konzentration ihr Minimum;

(8) bei Krebspatienten liegt die Konzentration des Skeletmuskels im Mittel signifikant über der des Normalkollektivs.

- . -

Abb. 1: Darstellung der Linearität der Indikatorreaktion in der 4,4'-Dithiodipyridin-Methode:

Freisetzung von y Mol 4-Mercaptopyridin (MTP) durch x Mol Carnitin (Carn.)

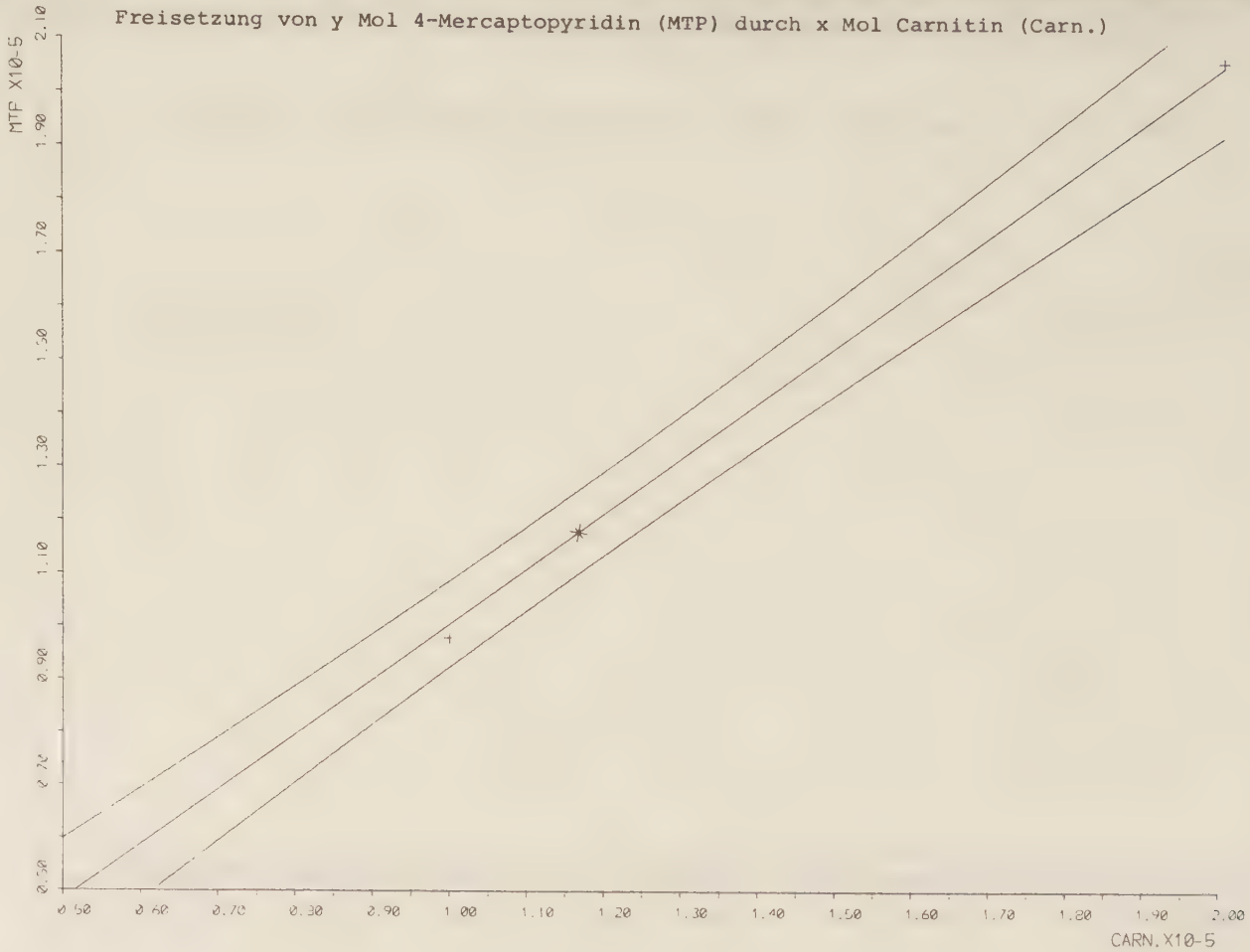


Abb. 2: UV-Spektrum des 4-Mercaptopyridins in Phosphatpuffer (pH 7,2, 0,1 Mol/l)

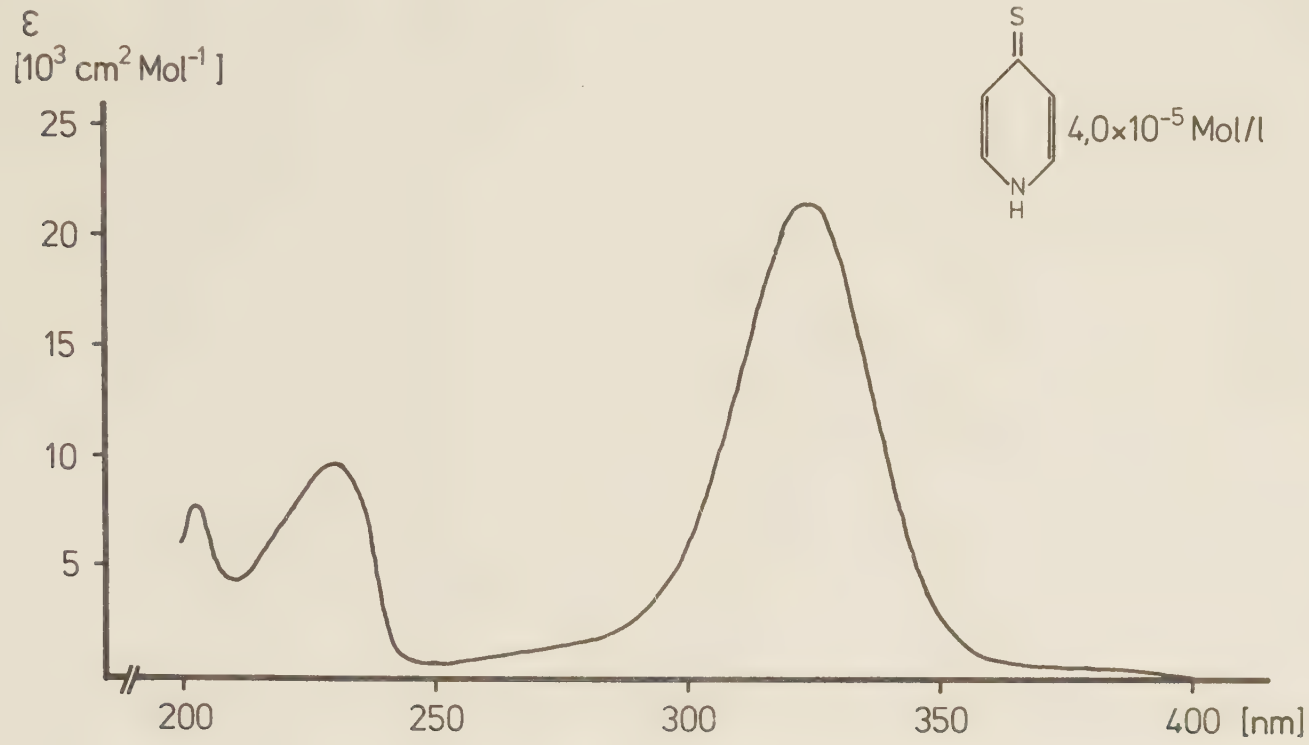


Abb. 3: UV-Spektrum des 4,4´-Dithiodipyridins in Phosphatpuffer (pH 7,2, 0,1 Mol/l)

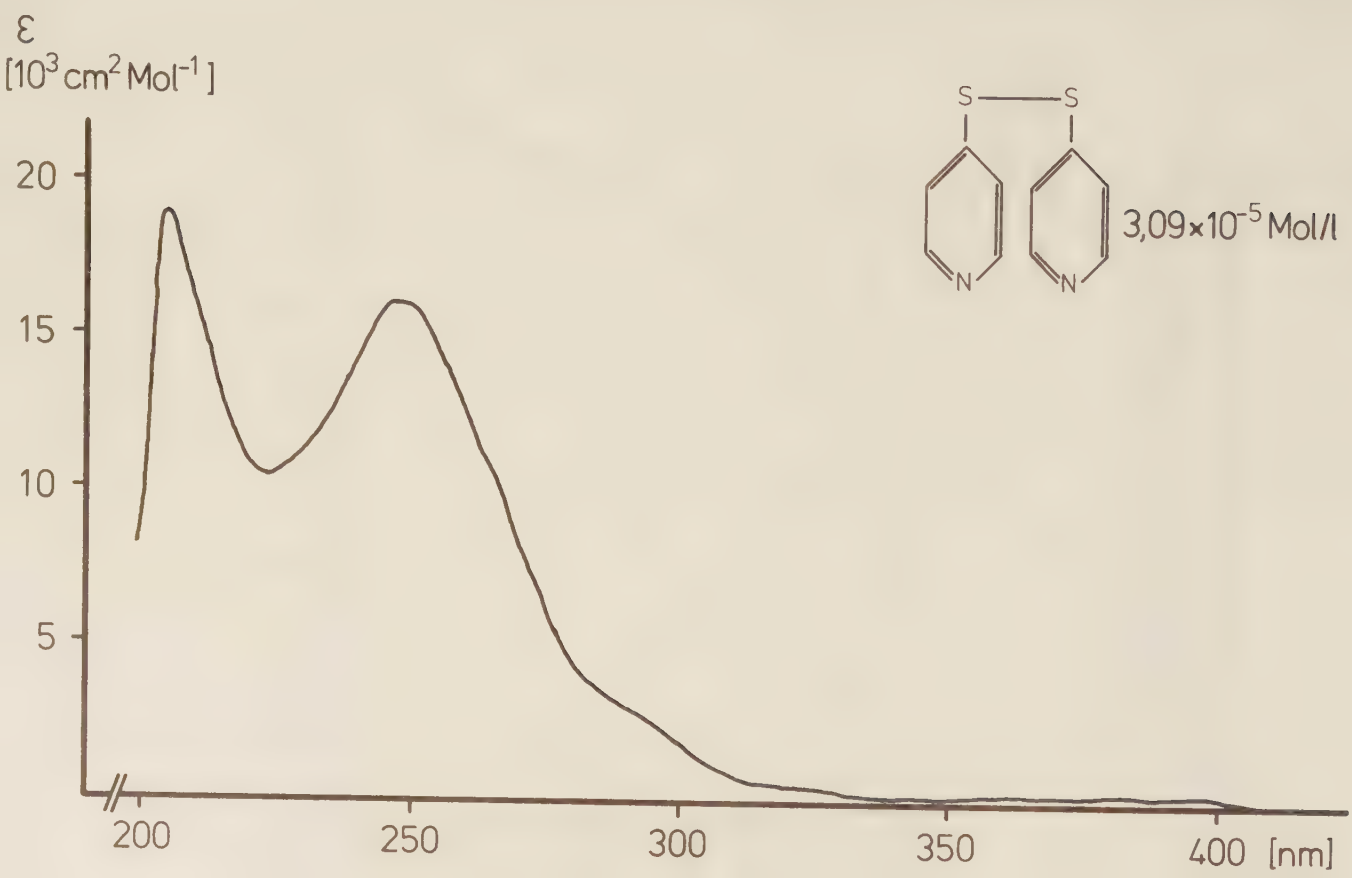


Abb. 4: Enzymaktivität der CAT (mU/Testansatz) in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt mit der DTNB- und 4,4´-DTP-Methode.

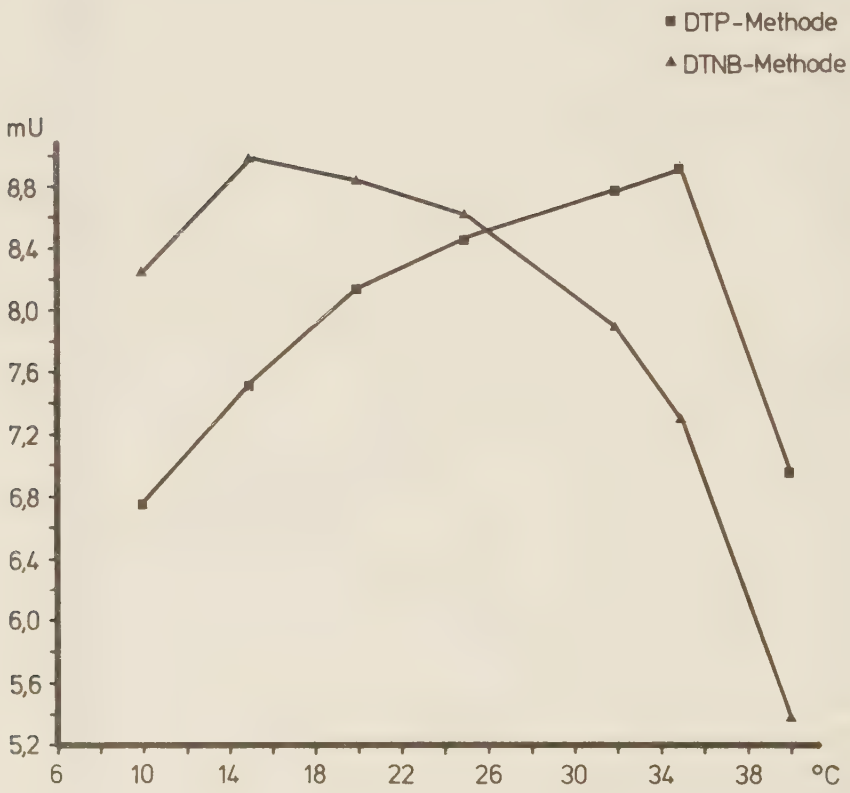


Abbildung 5

Postmortale Veränderung des Carnitingehaltes im menschlichen Muskel (M. pectoralis maior). Dargestellt sind die Mittelwerte der Muskelproben mit zugehörigen Vertrauensbereichen.

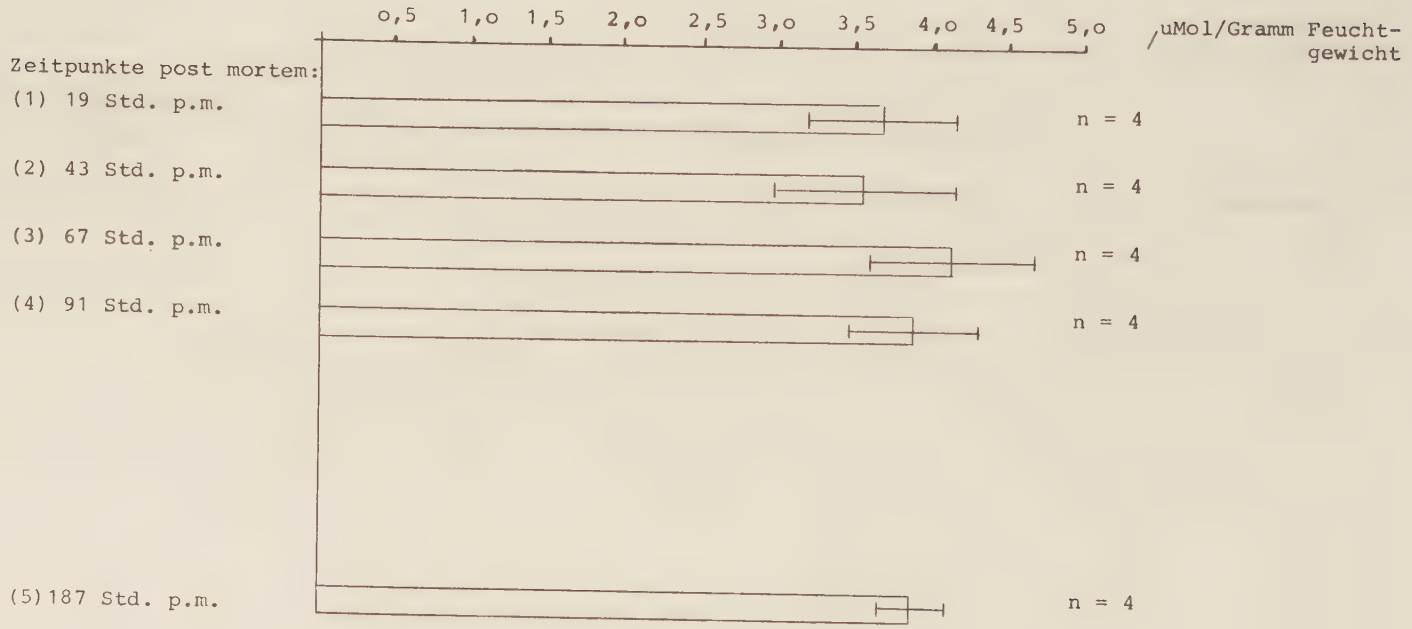


Abbildung 6

Postmortale Veränderung des Carnitingehaltes im Schweinemuskel (M. psoas maior). Dargestellt sind die Mittelwerte der Muskelproben mit zugehörigen Vertrauensbereichen.

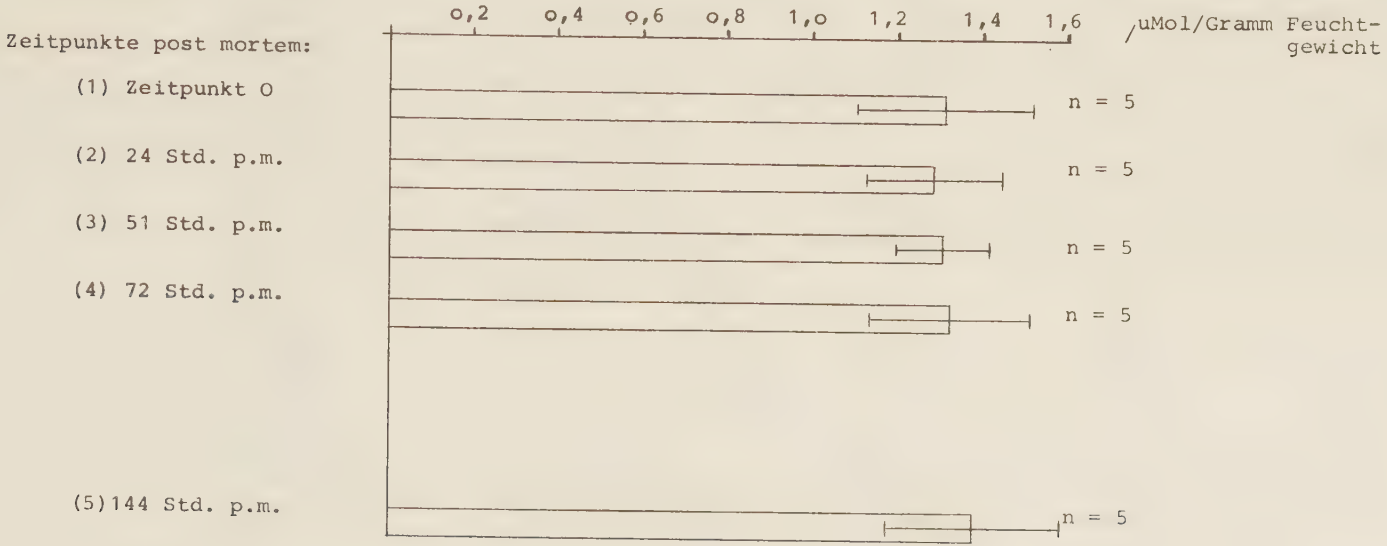


Abbildung 7

Carnitinkonzentration der menschlichen Muskulatur (Skeletmuskulatur und Myokard) in bezug zum Feuchtgewicht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Muskelproben mit zugehörigen Vertrauensbereichen.

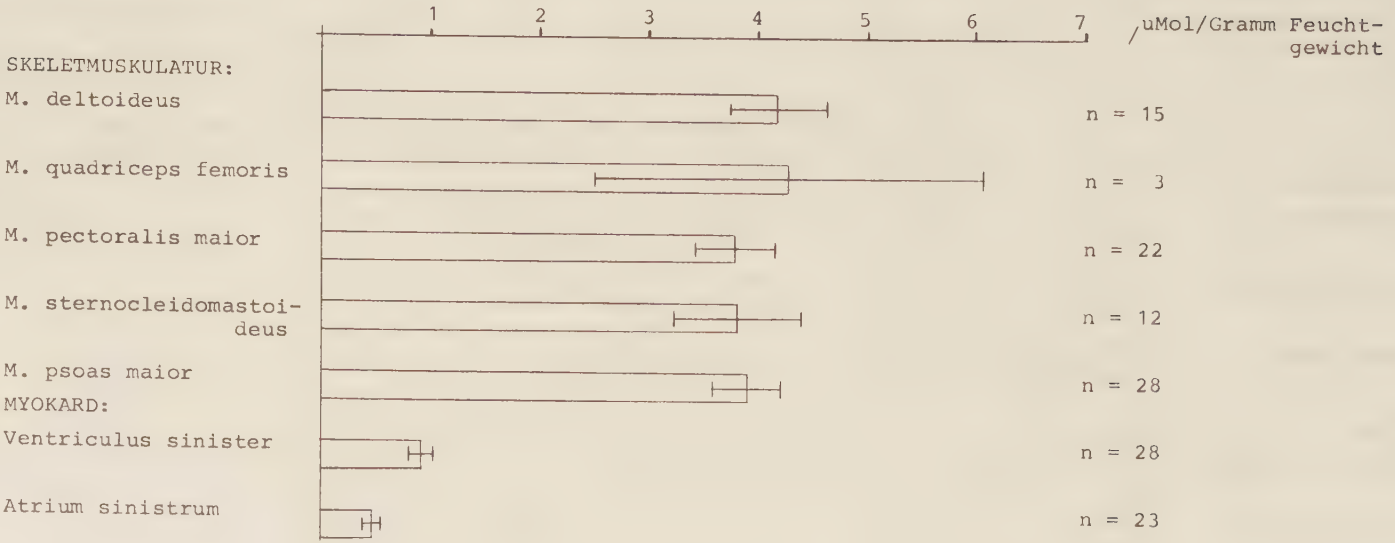


Abbildung 8

Carnitinkonzentration der menschlichen Muskulatur (Skeletmuskulatur und Myokard) in bezug zum Trockengewicht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Muskelproben mit zugehörigen Vertrauensbereichen.

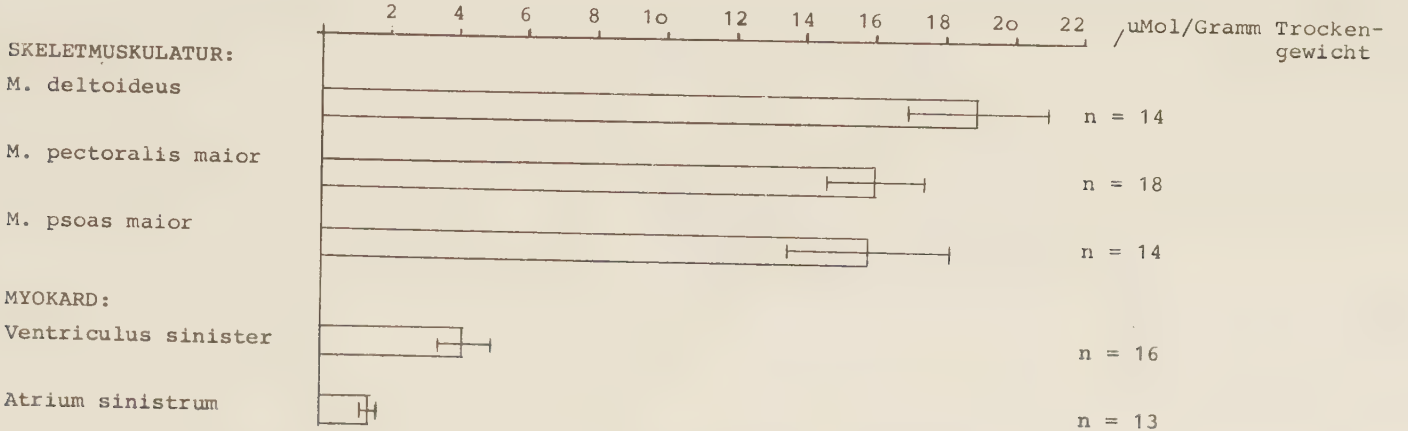


Abbildung 9

Carnitingehalt im menschlichen Muskel (Skeletmuskulatur und Myokard) in verschiedenen Altersklassen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Muskelproben mit zugehörigen Vertrauensbereichen. Vergleich der Versuchsgruppen nach dem t-Test und Abgabe der Irrtumswahrscheinlichkeit "p".

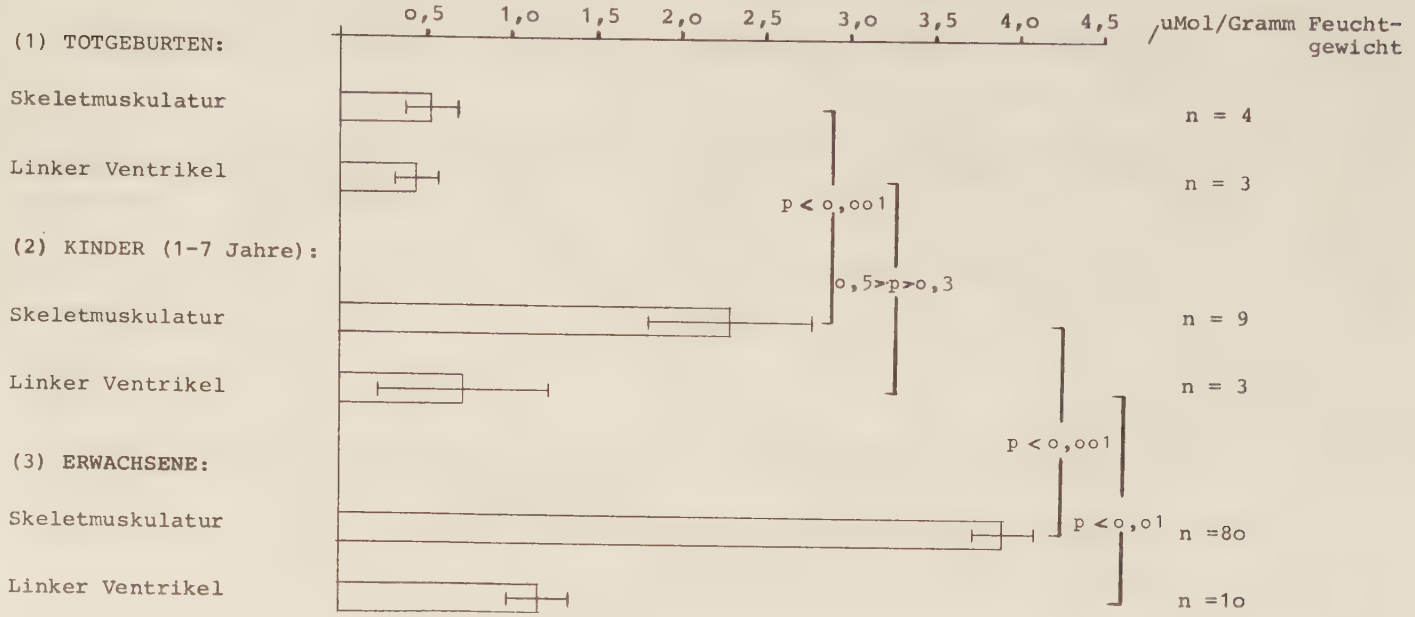


Tabelle 1

Molare Extinktionskoeffizienten des 4-Mercaptopyridins bei 334 nm bestimmt über die Extinktion verschiedener 4-Mercaptopyridin- und Carnitinkonzentrationen.-
Die Gesamtmittelwerte der errechneten Extinktionskoeffizienten unterscheiden sich nach dem t-Test nicht signifikant (p o,5).

SUBSTANZ	KONZENTRATION (x $1o^{-5}$ Mol/l)	EXTINKTION bei 334 nm (Mittelwert)	ANZAHL der MESSUNGEN	EXTINKTIONS-KOEFFIZIENT (x $1o^{3} cm^{2} Mol^{-1}$)	STANDARDAB-WEICHUNG
4- MTP	2,o	o,313	4	15,65	± o,125
	4,o	o,635	4	15,87	± o,o48
	5,o	o,778	4	15,56	± o,14o
			Gesamtmittelwert:	15,69	± o,16o
CARNITIN	o,5	o,o81	7	16,22	± o,292
	1,o	o,157	5	15,71	± o,251
	2,o	o,322	7	16,12	± o,29o
			Gesamtmittelwert:	16,o2	± o,27o

Tabelle 2

Extinktionskoeffizienten der 4-Thiopyridinderivate in Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2, o,1 Mol/l) mit Standardabweichung (± s) und Variationskoeffizient (VK).

FARBSTOFF	WELLENLÄNGE (nm)	ANZAHL der MESSUNGEN	MOLARER EXT.-KOEFF. (x $1o^3 cm^2 Mol^{-1}$) (±s)	VK (%)
4-Mercaptopyridin	23o	4	1o,16 ± o,17	1,7
	324	4	21,46 ± o,o6	o,3
	334	4	15,8o ± o,21	1,3
4,4'-Dithiopyridin	247	4	16,3o ± o,1o	o,6
	334	4	o,25 ± o,oo1	o,2

Tabelle 3

Gegenüberstellung der 4,4'-DTP- und der DTNB-Methode zur Carnitinbestimmung anhand ausgewählter Kriterien.

KRITERIEN	DTNB-METHODE	4,4'-DTP-METHODE
Präzision	nicht angegeben	in Carnitin-Standardlösungen (2o nMol/ml) wurden Werte von 19,9 ± o,36 nMol/ml (n=19) gefunden
Reproduzierbarkeit	nicht angegeben	3,o %
Empfindlichkeit (28)	o,o7 nMol Carnitin/ml	o,o6 nMol Carnitin/ml
Grenzkonzentration (28)	4o,3 x $1o^{-6}$g Carnitin im Test	47,4 x $1o^{-6}$g Carnitin im Test
Nachweisgrenze (28)	1,32 nMol Carnitin/ml	1,12 nMol Carnitin/ml
Umsatzgeschwindigkeit	Plateau erreicht nach etwa 4,9 min bei 2o°C	Plateau erreicht nach etwa 3,5 min bei 2o°C
Enzymzugabe	oft mehr als 2mal nötig	2mal
Temperatureinfluß	bei Raumtemperatur: keine ideale Nullinie und kein ideales Plateau durchSpontanhydrolyse des AcCoA	17°C (konstant): nur geringe Spontanhydrolyse des AcCoA mit fast idealer Leerwert- und Plateauregistrierung
pH-Einfluß	pH 7,8: stärkere Spontanhydrolyse; pH-Bereich des Indikators: 7,8 - 1o,4	pH 7,2: reduzierte Spontanhydrolyse; pH-Bereich des Indikators: 3,4 - 8,1
Enzymhemmung	DTNB hemmt CAT, dadurch höhere Carnitinmengen nicht genau bestimmbar	keine meßbare Beeinflußung der CAT durch DTP, daher Bestimmung höherer Carnitinmengen möglich
Einfluß der Temperatur auf die Hemmung	Anstieg der Enzymaktivität bis 16°C, Abnahme bis 36°C	Enzymaktivität zeigt Anstieg bis zum Temperaturoptimum (35°C)

Tabelle 4

Mittelwerte und Standardabweichungen der Carnitinkonzentration im menschlichen Myokard.

Zahl der Untersuchungen (n) in Klammern. Prüfung des statistischen Unterschiedes nach dem t-Test.

GEHALT (/uMol/Gramm)	VENTRICULUS SINISTER		ATRIUM SINISTRUM
Feuchtgewicht	0,9 ± 0,31 (n=29)	p < 0,001	0,47 ± 0,20 (n=23)
Trockengewicht	4,18 ± 1,47 (n=16)	p < 0,001	1,43 ± 0,49 (n=14)

Tabelle 5

Mittelwerte und Standardabweichungen der Carnitinkonzentration des menschlichen Myokards und Skeletmuskels im statistischen Vergleich. Zahl der Untersuchungen (n) in Klammern.

GEHALT (/uMol/Gramm)	VENTRICULUS SINISTER		SKELETMUSKULATUR
Feuchtgewicht	0,90 ± 0,31 (n=29)	p < 0,001	3,93 ± 0,83 (n=80)
Trockengewicht	4,18 ± 1,47 (n=16)	p < 0,001	16,84 ± 3,67 (n=46)

	ATRIUM SINISTRUM		SKELETMUSKULATUR
Feuchtgewicht	0,47 ± 0,20 (n=23)	p < 0,001	3,93 ± 0,83 (n=80)
Trockengewicht	1,43 ± 0,49 (n=14)	p < 0,001	16,84 ± 3,67 (n=46)

Tabelle 6

Mittelwerte und Standardabweichungen der Carnitinkonzentration im linken menschlichen Ventrikel unter normalen und pathologisch relevanten Verhältnissen.

Zahl der Untersuchungen (n) in Klammern. Prüfung des statistischen Unterschiedes nach dem t-Test.

(I) NORMALE VENTRIKEL	(II) H Y P E R T R O P H I E R T E VENTRIKEL			(III) PATHOLOGISCH ALTERIERTE VENTRIKEL
	(a) gesamte hypertrophierte Ventrikel	(b) leichte Hypertrophie (bis 500 g)	(c) schwere Hypertrophie (über 500 g)	
1,18 ± 0,3 uMol/ g Feuchtgewicht (n=10)	0,85 ± 0,2 uMol/ g Feuchtgewicht (n=11)	1,16 ± 0,3 uMol/ g Feuchtgewicht (n= 9)	0,72 ± 0,2 uMol/ g Feuchtgewicht (n= 5)	0,53 ± 0,01 uMol/ g Feuchtgewicht (n= 6)
5,99 ± 0,8 uMol/ g Trockengewicht (n= 3)	4,08 ± 1,0 uMol/ g Trockengewicht (n= 4)	5,22 ± 0,7 uMol/ g Trockengewicht (n= 6)	3,37 ± 1,0 uMol/ g Trockengewicht (n= 4)	2,74 ± 0,5 uMol/ g Trockengewicht (n= 5)

Statistische Auswertung:

Die Zahlen in der Tabelle bezeichnen die Irrtumswahrscheinlichkeit "p" für den statistischen Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen (z.B. $p < 0,01$).

Die Werte in Klammern beziehen sich auf Konzentrationsangaben pro Trockengewicht, diejenigen ohne Klammern auf Angaben pro Feuchtgewicht.

"ns" bedeutet nicht signifikant verschieden.

	I	IIa	IIb
IIa	0,01 (0,02)	-	ns
IIb	ns	-	-
IIc	0,01 (0,002)	ns	0,02 (0,01)
III	0,001 (0,001)	0,01 (0,05>p>0,02)	0,001 (0,001)

Tabelle 7

Mittelwerte und Standardabweichungen der Carnitinkonzentrationen im normalen menschlichen Atrium und im Atrium aus hypertrophierten Herzen.

Zahl der Untersuchungen in Klammern (n). Prüfung des statistischen Unterschiedes nach dem t-Test.

GEHALT (µMol/Gramm)	ATRIUM SINISTRUM NORMALE		ATRIUM SINISTRUM aus hypertrophiertem Myokard
Feuchtgewicht	0,48 ± 0,20 (n=18)	0,5 > p > 0,2	0,38 ± 0,20 (n= 5)
Trockengewicht	1,46 ± 0,46 (n= 8)	p < 0,5	1,39 ± 0,38 (n= 4)

Tabelle 8

Mittelwerte und Standardabweichungen der Carnitinkonzentration der gesamten Skeletmuskulatur, des M. psoas maior und des linken Ventrikel im Vergleich bei Männern und Frauen.

Zahl der Untersuchungen (n) in Klammern. Prüfung des statistischen Unterschieds nach dem t-Test.

MUSKEL (Gehalt in µMol/ Gramm Feuchtgewicht)	MÄNNER		FRAUEN
Skeletmuskulatur (gesamt)	3,99 ± 0,81 (n=44)	p < 0,9	3,83 ± 0,80 (n=22)
M. psoas maior	4,00 ± 0,79 (n=17)	p < 0,5	3,92 ± 0,75 (n= 9)
Linker Ventrikel	1,00 ± 0,29 (n=17)	p < 0,1	0,80 ± 0,30 (n= 9)

Tabelle 1b

Mittelwerte und Standardabweichungen der Carnitinkonzentration in der Skeletmuskulatur und im Myokard von Nicht-Diabetikern (Kontrolle) und Diabetikern.

Zahl der Untersuchungen (n) in Klammern. Prüfung des statistischen Unterschiedes nach dem t-Test.

MUSKEL (Gehalt in µMol/ Gramm Feuchtgewicht)	KONTROLLE		DIABETIKER
Skeletmuskulatur (gesamt)	3,93 ± 0,83 (n=72)	$p < 0,5$	3,82 ± 0,88 (n= 8)
Ventriculus sinister	0,90 ± 0,31 (n=29)	$p < 0,8$	0,93 ± 0,23 (n= 3)

Tabelle 1c

Mittelwerte und Standardabweichungen der Carnitinkonzentration in der Skeletmuskulatur von Carcinompatienten (Tumor) und von Patienten, die nicht an einem Tumor verstarben (Kontrolle).

Zahl der Untersuchungen (n) in Klammern. Prüfung des statistischen Unterschied nach dem t-Test.

SKELETMUSKULATUR (Gehalt in µMol/ Gramm)	KONTROLLE		TUMOR
Feuchtgewicht	3,75 ± 0,56 (n=20)	$p < 0,02$	4,25 ± 0,58 (n=12)
Trockengewicht	14,99 ± 1,40 (n=10)	$p < 0,001$	19,20 ± 2,70 (n= 7)

Tabelle 11

Mittelwerte und Standardabweichungen der Carnitinkonzentration (freies Carnitin und kurzkettige Acylcarnitine) in der Skeletmuskulatur und im Myokard verschiedener Spezies.

SPEZIES	ANGABE aus LIT.	M Y O K A R D (Gehalt in µMol/Gramm Trockengew.)	S K E L E T M U S K E L (Gehalt in µMol/Gramm Trockengew.)
Mensch	(12)	4,18 ± 1,5[a]	12,8 ± 2,9o
Ratte	(2o)	6,55 ± 1,85	3,o ± o,9o
Maus	(12)	4,7o ± o,7o	1,7 ± o,27

[a] eigene Untersuchungen

Tabelle 12

Mittelwerte und Standardabweichungen der Enzymaktivität der CPT in der Rattenleber (3) und der Carnitinkonzentration in der menschlichen Muskulatur in verschiedenen Lebensaltersklassen.

Anzahl der Untersuchungen (n) in Klammern.

SPEZIES - ORGAN	FETEN		KINDER		ERWACHSENE
RATTE: Leber CPT-Aktivität in /uMol/min x Gramm Leberprotein	o,o61 ± o,o1 (n= 7)		(8 Tage alt) o,34 ± o,o3 (n= 8)		o,51 ± o,o6 (n=11)
Prozentualer Zuwachs	-----	454	----------	5o	-----
MENSCH: Skeletmuskel Carnitingehalt in /uMol/ Gramm Feuchtgewicht	o,54 ± o,1o (n= 4)		(1 - 7 Jahre) 2,26 ± o,7o (n= 9)		3,93 ± o,83 (n=72)
Prozentualer Zuwachs	-----	318	----------	74	-----
MENSCH: Linker Ventrikel Carnitingehalt in /uMol/ Gramm Feuchtgewicht	o,5o ± o,o6 (n= 3)		o,7o ± o,2o (n= 3)		o,9o ± o,31 (n=29)
Prozentualer Zuwachs	-----	45	----------	2o	-----

Literaturverzeichnis

1. ABDEL-KADER, M.M., WOLF, G.: The distribution of carnitine and its possible function in corticosteroid biosynthesis. In: WOLF, G. (ed.) /146/, 147-156 (1964).

2. ALBERT, A., BARLIN, G.B.: Ionization constants of heterocyclic substances. Part III. Mercapto-derivates of pyridine, quinoline and iso-quinoline. In: ALBERT, A., BADGER, G.M., SHOPPE, C.W. (eds.). Current trends in heterocyclic chemistry. Butterworth, London (1958).

3. AUGENFELD, J., FRITZ, I.B.: Carnitine palmitoyltransferase activity and fatty acid oxidation by livers from neonatal and fetal rats. Can.J.Biochem. 48, 288-294 (197o).

4. BAIRD, D.G., HEITZMAN, R.J., SNOSWELL, A.M.: Effects of a glucocorticoid on the concentration of CoA and carnitine esters and on redox state in bovine liver. Eur.J.Biochem. 29, 1o4-1o9 (1972).

5. BARGMANN, W. (ed.): Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 6. Aufl., Thieme Verlag Stuttgart (1967).

6. BASS, A., BRDICZKA, D., EYER, P., PETTE, D.: Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organisation. Eur.J.Biochem. 1o, 198 (1969).

7. BETHE, A., BERGMANN, G.v., EMBDEN, G., ELLINGER, A. (eds.): Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie. 5. Bd. Springer Verlag Berlin (1928).

8. BØHMER, Th., NORUM, K.R., BREMER, J.: The relative amounts of long-chain acylcarnitine, acetylcarnitine and free carnitine in organs of rats in different nutritional states and with alloxan diabetes. Biochim.Biophys.Acta 125, 244-251 (1966).

9. BROEKHUYSEN, J., BAUDINE, A., DELTOUR, G.: Effects of carnitine on acidosis and ketosis induced by lipid perfusions in dog during starvation. Biochim.Biophys.Acta 1o6, 2o7-21o (1965).

1o. - , ROZENBLUM, C., GHISLAIN, M., DELTOUR, G.: Distribution of carnitine in rat. In: WOLF, G. (ed.) /146/, 23-25 (1964).

11. CASILLAS, E.R., NEWBURGH, R.W.: Carnitine and derivates in embryonic chick tissue. Biochim.Biophys.Acta 184, 566-577 (1969).

12. CEDERBLAD, G., LINDSTEDT, S.: A method for the determination of carnitine in picomole range. Clin.Chim.Acta 37, 235-243 (1972).

13. CHAPPEL, J.B., CROFTS, A.R.: The effect of atractylate and oligomycin on the behaviour of mitochondria towards adenine nucleotides. Biochem.J. 95, 7o7-716 (1965).

14. CHASE, J.F.A.: The substrate specificity of carnitine acetyltransferase. Biochem.J. 1o4, 51o-518 (1967).

15. COSTA, G.: Cachexia. In: HOLLAND, J.F., FREI III, E. (eds.). Cancer Medicine, Lea and Febinger Philadelphia (1974).

16. ELLMAN, G.L.: Tissue sulfhydryl groups. Arch.Biochem.Biophys. 82, 7o-77 (1959).

17. FRIEDMAN, S., FRAENKEL, G.: Reversible enzymatic acetylation of carnitine. Arch.Biochem.Biophys. 59, 491-5o1 (1955).

18. FRITZ, I.B.: The effects of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates. Acta Physiol.Scand. 34, 367-385 (1955).

19. - : Effects of choline deficiency and carnitine on palmitic acid oxidation by rat liver homogenates. Am.J.Physiol. 19o, 452-499 (1957).

2o. - , MARQUIS, N.R.: Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues. J.Lipid Res. 5, 184-187 (1964).

21. - , SCHULTZ, S.K.: Carnitine acetyltransferase. II. Inhibition by carnitine analogues and by sulfhydryl reagents. J.Biol.Chem. 24o, 2188-2193 (1965).

22. - , YUE, K.T.N.: The site of carnitine action on long-chain fatty acid oxidation: a possible new pathway for acyl CoA formation in heart muscle. Physiologist 5, 144-149 (1962).

23. - , - : Long-chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivates in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine. J.Lipid Res. 4, 279-288 (1963).

24. - , - : Action of carnitine on long-chain fatty acid oxidation by liver. Am.J.Physiol. 197, 279-3o4 (1959).

25. GRASSETTI, D.R., MURRAY, J.R. jr.: Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiopyridine. Arch.Biochem.Biophys. 119, 41-49 (1967).

26. HARPER, H.A., LÖFFLER, G., PETRIDES, P.E., WEISS, L.: Substratstoffwechsel der Muskelzelle. In: HARPER, H.A., PETRIDES, P.E., WEISS, L. (eds.). Physiologische Chemie, Springer Verlag Berlin (1975).

27. - : Stoffwechselwirkungen der Glucocorticoide. In: HARPER, H.A., PETRIDES, P.E., WEISS, L. (eds.). Physiologische Chemie, Springer Verlag Berlin (1975).

28. KOCH, O.G., KOCH-DEDIC, G.A.(eds.): Handbuch der Spurenanalyse. 2. Aufl., Springer Verlag Berlin (1975).

29. KOENIGS, F., KINNE, G.: y-Pyridylmercaptan. Chem.Ber. 54, 1359-136o (1921).

3o. LEMARCHANT, J.M., TEITELBAUM, M., MILLER, G.: La carnitine dans le traitement de quarante malades hospitalisés pour maigreur nerveuse. Sem.Hop. 4o, N. 56, 2246-2249 (1964).

31. MARQUIS, N.R., FRITZ, I.B.: The distribution of carnitine, acetylcarnitine and carnitine acetyltransferase in rat tissue. J.Biol. Chem. 24o, 2193-2196 (1965).

32. MEHLMAN, M.A., ABDEL-KADER, M.M., THERRIAULT, D.G.: Metabolism, turn-over time, half life, body-pool of carnitine ^{14}C in normal, alloxan diabetic and insulin treated rats. Life Sci (II) Vol. 8, 465-472 (1969).

33. OGATA, T., MASAHIKO, M.: Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles. J.Histochem.Cytochem. 12, 171-182 (1964).

34. PEARSON, D.J., TUBBS, Ph.K.: Carnitine and derivates in rat tissue. Biochem.J. 1o5, 953 (1967).

35. - , - , CHASE, J.F.A.: Carnitine and acylcarnitine. In: BERGMEYER, U. (ed.). Methoden der enzymatischen Analyse II., 3. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie (1974).

36. ROTZSCH, W., LORENZ, I., STRACK, E.: Über die Toxizität des Carnitins und einiger verwandter Stoffe. Acta Biol.Med.Germ. 3, 28-36 (1959).

37. SACHS, L. (ed.): Statistische Auswertungsmethoden. Springer Verlag Berlin (1971).

38. SANDRITTER, W., BENEKE, G.(eds.): Allgemeine Pathologie. F.K. Schattauer Verlag Stuttgart (1974).

39. SIEGENTHALER, W.: Stoffwechsel der Neoplasien. In: SIEGENTHALER, W. (ed.). Klinische Pathophysiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1973).

4o. SMITH, H.A., DOUGHTY, G., GORIN, G.J.: Mercaptan-disulfide interchange reactions. III. Reaction of cysteine with 4,4'-dithiobis (benzonesulfonic acid). J.Org.Chem. 29, 1484-1488 (1964).

41. SNOSWELL, A.M., HENDERSON, G.D.: Aspects of carnitine ester metabolism in sheep liver. Biochem.J. 119, 59-65 (197o).

42. - , KOUNDAKJIAN, P.P.: Relationship between carnitine and coenzym A esters in tissues of normal and alloxan-diabetic sheep. Biochem. J. 127, 133-141 (1972).

43. STADTMAN, E.R.: Preparation and assay of acyl coenzym A and other thiol esters; use of hydroxylamine. In: COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O. (eds.). Methods in Enzymology III, Academic Press Inc., Publishers, New York (1957).

44. STRACK, E., KUNZE, D., MÜLLER, H.-P.: Über den Einfluß von Carnitin auf die Ketonkörperbildung in vivo und in vitro. Acta Biol.Med.Germ. 12, 716-718 (1964).

45. THOMITZEK, W.D.: Die Rolle des Carnitins im Intermediärstoffwechsel. Ergeb.Physiol. 62, 68-9o (197o).

46. WITTELS, B., BRESSLER, R.: Lipid metabolism in the newborn heart. J.Clin.Invest. 44, 1639-1646 (1965).

Abkürzungen und Symbole

AcCoA	Acetylcoenzym A
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CAT	Carnitin-Acetyltransferase
CoA	Coenzym A
CPT	Carnitin-Palmityltransferase
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoat
DTP	4,4'-Dithiodipyridin
E	Extinktion
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E.C.	Enzyme Commission Number
MTP	4-Mercaptopyridin
PP	Pyrophosphat
p.m.	post mortem

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Wolf-Dieter Thomitzek, möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank für die Vergabe des interessanten Themas aussprechen.

Seine große Mühe bei der Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken hat es mir erst ermöglicht, über die Promotionsarbeit hinaus weitere wissenschaftliche Projekte aufzugreifen und selbständig zu bearbeiten.

Lebenslauf

1. 6. 1951	geboren als Sohn des Oberleutnants a.D. und kaufmännischen Angestellten Karlheinz Bunke und seiner Ehefrau Helga, geb. Bongards, in Krefeld-Uerdingen
1957 – 1961	Besuch der Gemeinschaftsschule 61 g in Krefeld-Uerdingen
1961 - 1970	nach bestandener Aufnahmeprüfung Besuch des Gymnasiums Fabritianum in Krefeld-Uerdingen
19. 6. 1970	Reifeprüfung
1. 11. 1970 - 31. 7. 1971	Beschäftigung als Hilfspfleger im St. Josefs-Hospital in Krefeld-Uerdingen
6. 1971	Bewerbung um einen Studienplatz im Fach Medizin an der Universität Louis Pasteur in Straßburg/Frankreich
11. 10. 1971	Immatrikulation an der Universität Louis Pasteur nach Absolvierung eines Vorbereitungskurses für Ausländer auf das Studium in Frankreich mit abschließender Sprachprüfung
1971 - 1973	Studium von 3 Semestern Medizin
4. 1973	Aufnahme des Medizinstudiums an der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf im 2. Fachsemester
1975	Ärztliche Vorprüfung; Beginn der Promotionsarbeit
1976	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Übernahme eines Forschungsauftrages am Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung auf dem Sektor der Tumorimmunologie
9./10. 1977	Bericht über die Ergebnisse des Forschungsauftrages auf 2 Kongressen und in mehreren Veröffentlichungen
17. 3. 1978	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
17. 4. 1978 - 16. 3. 1979	Praktisches Jahr in den Städtischen Krankenanstalten Krefeld
25. 4. 1979	Rigorosum über die Promotionsarbeit
8. 5. 1979	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
7. 6. 1979	Approbation als Arzt

gez.: Reinhard Bunke